

インスリンの線維化要因および
線維化がインスリンの吸収に与える影響に関する研究

大野 由依

目次

略語と記号	・・・3
緒言	・・・5
第1章 ヒトインスリンの線維化要因の解析	
第1節 小緒言	・・・8
第2節 ヒトインスリンの線維化における線維化結晶共存の影響	・・・12
第3節 ヒトインスリンの線維化における製剤中添加剤と pH の影響	・・・14
第4節 小括	・・・22
第2章 インスリンの化学構造の違いによる線維化の比較	
第1節 小緒言	・・・23
第2節 持効型インスリン製剤の線維化の比較	・・・27
第3節 持効型インスリン製剤の線維化における異種核共存の影響	・・・35
第4節 新規インスリン誘導体の合成とその活性および線維化の検討	・・・39
第5節 小括	・・・51
第3章 皮下に存在する線維化ヒトインスリンのヒトインスリン吸収性への影響	
第1節 小緒言	・・・53
第2節 線維化ヒトインスリン投与部位の状態の確認	・・・55
第3節 線維化ヒトインスリン投与部位でのヒトインスリン吸収性の解析	・・・59
第4節 線維化ヒトインスリンによるヒトインスリンの吸収障害機構の理解	・・・61
第5節 小括	・・・63
結論	・・・64
謝辞	・・・68
実験の部	
第1章	・・・70
第2章	・・・75
第3章	・・・85
参考文献	・・・90

記号と略号

QOL	生活の質 quality of life
IDA	インスリン由来アミロイドーシス insulin-derived amyloidosis
ADL	日常生活動作 activities of daily living
MW	分子量 molecular weight
ThT	チオフラビン T thioflavin T
S.D.	標準偏差 standard deviation
PBS	リン酸塩緩衝生理食塩水 phosphate-buffered saline
MWCO	分画分子量 molecular weight cut off
PBA	フェニルボロン酸 phenylboronic acid
PBA-Ins	フェニルボロン酸修飾インスリン phenylboronic acid-modified insulin
CD	円二色性 circular dichroism
4CPBA	4-カルボキシフェニルボロン酸 4-carboxyphenylboronic acid
MALDI TOF-MS	マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析装置 matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

TNBS	2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 2,4,6-trinitrobenzene-1-sulfonicacid
FD-10	FITC-Dextran average mol wt 10,000 Fluorescein Isothiocyanate-Dextran average mol wt 10,000
C_{max}	最高血中濃度 maximum blood drug concentration
AUC	血中濃度－時間曲線下面積 area under the blood concentration time curve

緒言

世界中の糖尿病患者数は、2019 年時点で 4 億 6300 万人に上り、2045 年までには 7 億人に達すると言われている[1]。わが国における糖尿病患者数は、生活習慣や社会環境の変化に伴い急速に増加し、2016 年時点で推計 1000 万人に達する[2]。糖尿病は、高血糖発症初期では無症状だが、放置することで、網膜症・腎症・神経障害などの合併症を引き起こし、失明や透析治療の導入、壊疽による足の切断に至ることもあり、患者の生活の質(QOL)を著しく低下させる。さらには、動脈硬化により、虚血性心疾患や脳梗塞などの発症・進展を促進し、死に至ることもある。また、2019 年時点での糖尿病関連の医療費は世界中で約 83 兆円(7600 億ドル)に上り、医療経済にも大きな負担をもたらしている[1]。糖尿病患者のインスリン分泌動態の障害の程度は患者によって様々であり、患者個々のインスリン分泌動態やそれぞれのライフスタイルに合った、有効かつ効果的な治療を行っていくことが重要である[3, 4]。

インスリンは、1 型糖尿病のみならず、2 型糖尿病の治療においても適応され、現在、種々のアナログ製剤が臨床で広く用いられているほか、誘導体の利用が試みられている。糖尿病患者の 9 割は、インスリンの分泌低下やインスリン抵抗性が生じる 2 型糖尿病であるが、2 型糖尿病に対しても、糖毒性による膵 β 細胞の疲弊防止と合併症の進行抑止のために、インスリンを用いた治療は必須の治療法であると考えられている[5]。

近年、インスリン療法では、注射されたインスリンがアミロイドタンパク質に変化し、注射部位の皮下に沈着する合併症が問題視され始めた[6-25]。皮下でのインスリンのアミロイド沈着自体は、1983 年にヒトにおいてはじめて報告された[26]。それが広く問題視され始めたのはここ 10 数年のことである。2009 年に永瀬らによって、皮下でのインスリンのアミロイド沈着により大きなボール状となった硬い皮下腫瘍がインスリンボールと命名された[8]。この命名以前は、医原性インスリン依存性局所アミロイドーシス(Iatrogenic, insulin-dependent, local amyloidosis)[26]、皮下アミロイド沈着(subcutaneous amyloid deposition)[6]や、インスリン注射部位での局所皮膚アミロイド(Localized cutaneous amyloid at an insulin injection site)[7]など様々な表現がされていたが、最近では、インスリン由来アミロイドーシス(Insulin-derived amyloidosis; IDA)[9, 15, 16, 19, 20-23, 25]またはインスリンボール[8, 17]が主要な呼称となってきた。

IDA やインスリンボールなどの皮下でのインスリンのアミロイド沈着は、同一部位へのインスリンの繰り返し投与によって生じると考えられている[8, 11-25]。インスリンは、同一部位に繰り返し注射せず、毎回異なる部位に順番に注射することが推奨されている[27]が、同一部位に投与している患者や、左右交互に注射しているものの左右の同一部位に注射している患者も少なくない。IDA やインスリンボールが生じた部位では、インスリンの吸収障害が起き、血糖コントロールの悪化を招く[8, 12, 14, 15]。また、それに伴い、インスリンの投与量が増量するため、患者の医療費負担の増加に繋がっている[15]。IDA やインスリンボール部位でのインスリンの平均吸収率は正常部位の 34%[15]で、わずか 6%であった患者も存在すると報告されている[12]。また、それらの部位での平均インスリン投与量は 57 単位/日で、注射部位を正常部位に変更した場合、平均インスリン投与量は 27 単位/日となり、約 30 単位減少した例もある[15]。しかし、注射部位の変更が患者と医

師の双方の合意上であれば問題はないが、日常的に IDA やインスリンボール部位に自己注射している患者に対し、医師が、患者に IDA やインスリンボールなどが生じていると気づかずに、血糖コントロールの悪化からインスリンを増量し、患者がたまたま正常部位に自己注射したことで、重篤な低血糖に陥った症例も報告されている[15]。近年のインスリン治療では、一般的に超速効型インスリン製剤や持効型インスリン製剤などが使用されているが、これらにおいても IDA やインスリンボールなどの皮下アミロイド沈着が形成される[6, 8, 9, 11-13, 15, 16, 18, 19]。投与インスリンの皮下アミロイド沈着の症例報告数は、2000 年から 2007 年にかけて数件であったのに対し、2008 年から 2011 年で 20 件以上となり、2012 年から 2015 年で 80 件を超え、年々増加している[28]。増加理由は明確になっていないが、IDA やインスリンボールなどに対する認識の高まりに加え、診断の進歩や、インスリン療法自体の変化、新しい製剤の登場などもその理由のひとつとして挙げられている[28]。わが国においては、超高齢化に伴い、65 歳以上の糖尿病人口が増加し、2019 年時点では世界第 6 位の 490 万人に上る[1]。高齢者は、日常生活動作(ADL)・認知機能の低下などにより、毎回注射部位を少しずつ変えながら注射するといった正しい注射手技でインスリン注射を行うことが困難な場合がある。高齢化により、今後、そのような患者が増えることも予想される。IDA やインスリンボールなどの皮下アミロイド沈着の発生・放置は、血糖コントロールの悪化による合併症の発症に繋がるだけでなく、インスリンの投与量の増量に伴う患者の医療費負担の増加も招く。IDA やインスリンボールは患者の誤った注射手技によって引き起こされる合併症と考えられているが、決して軽視してはならない問題である。

IDA やインスリンボールは、アミロイド沈着を含まないリポハイパートロフィーと区別が難しく、しばしば誤診されることがある[12, 29]。リポハイパートロフィーは、IDA やインスリンボールと同様に、インスリン療法の皮膚合併症であるが、アミロイド沈着ではなく、脂肪が増生した状態である[16, 17, 30, 31]。リポハイパートロフィーは IDA やインスリンボールと同様に、同一部位へのインスリンの繰り返し投与によって引き起こされ、目視で確認可能な腫瘍が形成される。インスリンの吸収障害も同様に起こるが、IDA やインスリンボールよりも軽度であることが多い[12, 33]。両者の腫瘍の違いは、視診では判断しがたく、近年リポハイパートロフィーと思われていた患者が、IDA やインスリンボールであったという報告もある[12, 29]。リポハイパートロフィーは軟性の腫瘍で、インスリンボールは硬性の腫瘍であるとされている。しかし、リポハイパートロフィーでも硬性の場合や、線維化したインスリンボールでも軟性の場合もあり、触診では判別不可能である[17]。両者を判別するためには、CT や MRI などの画像検査が一助となるが、確定診断には病理診断が必要で、患者の負担にもなるため、それらは回避することが望ましい。

IDA やインスリンボールは 10 数年前から使われ始めた用語であるが、現在、これらに世界的に共通認識されている明確な定義付けはない。そのため、リポハイパートロフィーに対して IDA やインスリンボールという言葉が使用されていた例も少なくない。特に患者が情報を得やすいインターネット上では、誤った情報も散見される。そこで、本研究においては、投与インスリンの皮下アミロイド沈着に関して、最近の学会での動向も踏まえ、Table 1 に示すように定義し、使用することとした。すなわち、皮下アミロイド沈着を 2 種に分類し、アミロイド線維の沈着により、目視では外見上の明確な変化がないものを IDA、目視で確認できる腫瘍が生じたものをインスリンボールとする。

Table 1 Definition of IDA, insulin ball and lipohypertrophy in this thesis.

IDA	インスリンボール	リポハイパートロフィー
投与インスリンの 皮下アミロイド沈着	投与インスリンの 皮下アミロイド沈着の増生	皮下脂肪の 肥大・増生
目視で外見上に 変化はない	目視で腫瘍が認められる (硬性の皮下腫瘍)	目視で腫瘍が認められる (軟性の皮下腫瘍)
インスリンの 吸収障害	重篤なインスリンの 吸収障害	軽度なインスリンの 吸収障害

患者の治療において、IDA やインスリンボール、リポハイパートロフィーが生じることを回避することは重要である。インスリンを調剤し、患者に服薬指導を行う薬剤師が、適切な指導を行うとともに、血糖コントロールの状態と患者への問診の評価結果から、IDA やインスリンボール等の存在に気付くことが必要であると考えられる。そのためには、IDA やインスリンボールが生じる条件や、それが促進される要因を知ることは重要である。また、IDA が生じる原因を明確にすることができれば、IDA やインスリンボールを生じにくい新規インスリン製剤を開発することも可能であり、糖尿病患者の QOL 向上に必ず役立つ。さらに、医療費の削減はわが国の社会的課題の解決に繋がる。

本研究では、インスリンの線維化に関わる要因を解明するために、実際に臨床で使用されている製剤を用いて、インスリンの線維化に及ぼす製剤中添加剤の影響や、製剤中での会合状態、分子構造の違いに着目した。また、IDA やインスリンボールを回避できる新規インスリンの検討、IDA やインスリンボールによるインスリン吸収障害性の考察など、臨床での問題から製剤開発までの広い範囲に視点を当て、基礎的な研究を行った。すなわち、第 1 章では、ヒトインスリンの製剤であるヒューマリン®R の線維化要因に関して、線維化結晶共存下での線維形成性と、ヒューマリン®R 中の添加剤や pH 変化が線維化に与える影響を *in vitro* で評価した。第 2 章では、第 1 章を踏まえた上で、持効型インスリン製剤の線維化の比較と、持効型インスリン製剤の線維化に対するヒトインスリンの線維化結晶の影響を調べた。さらに、IDA やインスリンボールを回避可能な新規インスリンとして、糖への結合能を有するフェニルボロン酸 (PBA) をヒトインスリンに修飾し、その血糖降下作用と線維化能を調べた。第 3 章では、線維化ヒトインスリンが皮下に存在するラットを作製し、同部位でのヒトインスリン (Molecular Weight (MW):5807) と FITC-Dextran (MW:10000, FD-10) の吸収性を比較するとともに、血流量や血管透過性の変化を評価することで、IDA やインスリンボールにおけるインスリン吸収障害機構の理解を試みた。

第1章 ヒトインスリンの線維化要因の解析

第1節 小緒言

ヒトインスリンは、21 個のアミノ酸残基からなる A 鎖と、30 個のアミノ酸残基からなる B 鎖の計 51 個のアミノ酸で構成される。構造中に 3 つのジスルフィド結合を有し、そのうちの 2 つで A 鎖と B 鎖が架橋されている[33, 34] (Fig. 1)。ヒトインスリンは、インスリン自体の濃度や pH などによって、モノマーやダイマー、ヘキサマーへと立体構造が変化し、さらにこれらは平衡状態で存在している[35-38]。また、製剤中の添加剤 (Table 2) の存在によっても、インスリンの立体構造の平衡状態は変化する (Fig. 2) [38]。例えば、亜鉛イオンは、ダイマーを形成するモノマーのそれぞれと結合し、2 つの亜鉛イオンを中心にダイマーが 3 つ集まり、ヘキサマーの形成を促進する (Fig. 2) [35]。

ヒトインスリンのヘキサマーの存在状態は主として 2 種類ある。ひとつは、亜鉛イオン存在下で亜鉛イオンが露出している緊張 (tense, T) 形態を形成する T₆ 立体配置のヘキサマーである (Fig. 2) [39-41]。防腐剤として含有されている *m*-クレゾールやフェノールが存在すると、ヘキサマーのモノマー間の疎水ポケットに結合し、亜鉛イオンが露出していない弛緩 (relax, R) 形態を形成する R₆ 立体配置のヘキサマーを形成する[39-41]。このように、ヒトインスリンの立体構造には、製剤中の添加剤 (Table 2) が密接に関与している。ヒトインスリンの製剤であるヒューマリン®R は、注射薬の段階ではヒトインスリンは R₆ ヘキサマーを形成し、皮下注射後にダイマー、モノマーへと解離する。その後、ダイマーとモノマーは毛細血管から吸収され、モノマーがインスリン受容体に結合し、血糖降下作用を示す (Fig. 3) [33]。

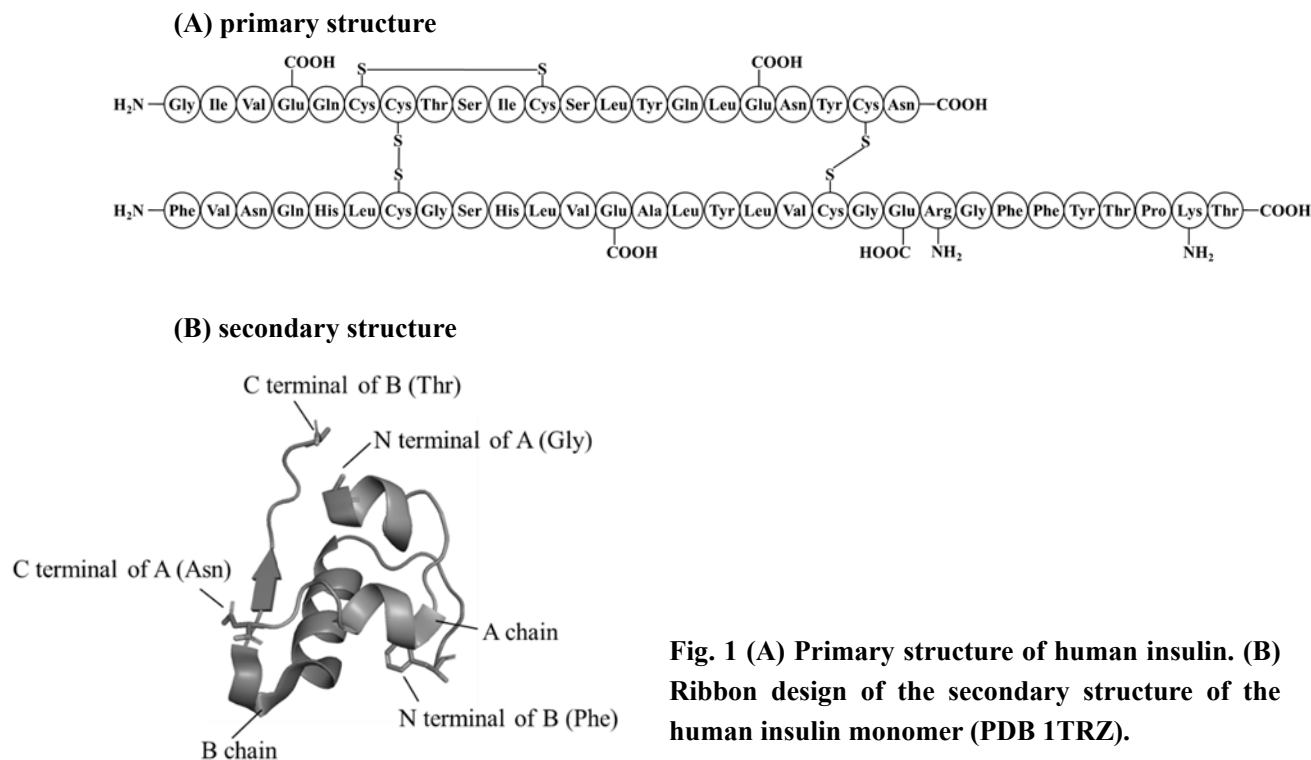


Fig. 1 (A) Primary structure of human insulin. (B) Ribbon design of the secondary structure of the human insulin monomer (PDB 1TRZ).

Table 2 Composition and behavior in Humulin®R.

100 IU/mL

formulation name [company]	main medication [MW]	pH	zinc ion [MW]	<i>m</i> -cresol [MW]	glycerin [MW]	other additives
Humulin®R [Eli Lilly]	Human insulin [5807.6]	7.0-7.8	0.015 mg [65.38]	2.5 mg [108.14]	16.0 mg [92.1]	pH regulator

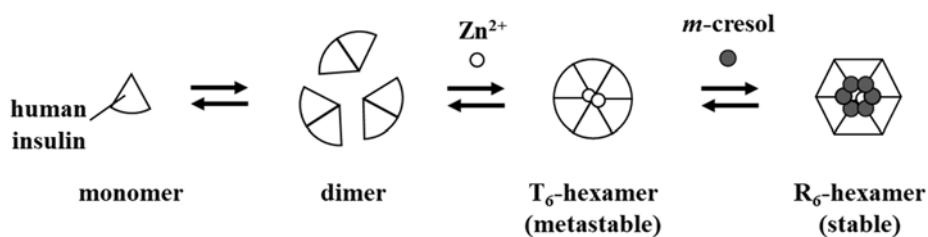


Fig. 2 Relationship between human insulin conformational and additives in the formulations.

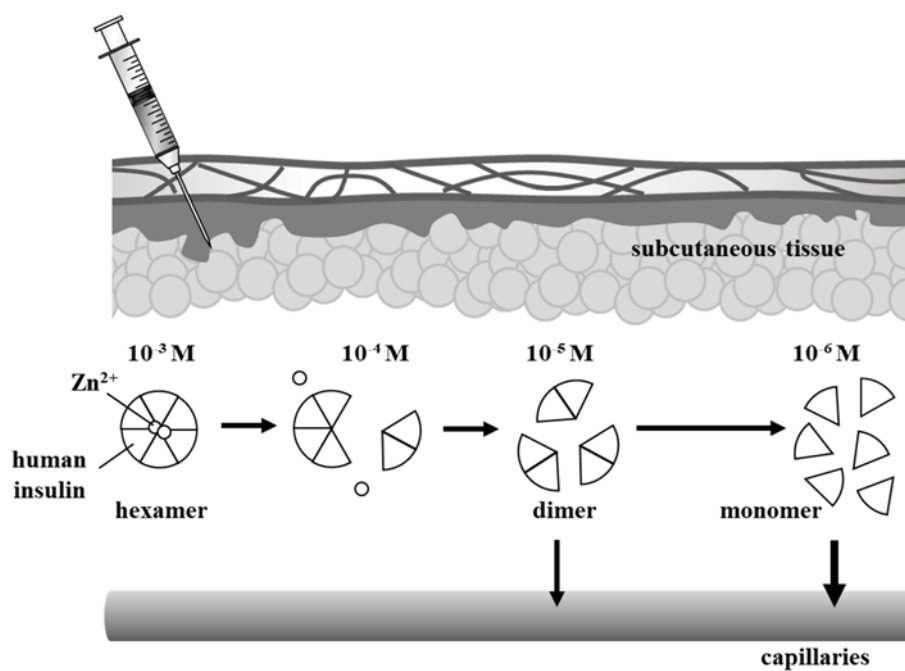


Fig. 3 Human insulin absorption process after the subcutaneous injection.
The value is the human insulin concentration.

インスリンの皮下アミロイド沈着は、通常 α ヘリックス構造であるインスリンが β シート構造へと変換され、それが積層し、不溶性のアミロイド線維として沈着したものである[24]。インスリンの他にも、アミロイド β や α -シヌクレイン、トランスサイレチン、 $\beta 2$ ミクログロブリン、リゾチームなど多くのタンパク質がアミロイド線維を形成することが報告されている[42, 43]。In vitro において、 α ヘリックス構造から β シート構造への変換が起こり、不溶性のアミロイド線維が生じることを、一般的に線維化と呼んでいる。一方、in vivo でこの変換が生じ、生じた不溶性のアミロイド線維が全身諸臓器へ沈着した状態をアミロイドーシスと呼ぶ[24]。

ヒトインスリンは、タンパク質の線維化機構を解明する研究において、今日に至るまで、モデルタンパク質として多く使用されてきた[44-57]。その過程で、ヒトインスリンは加熱や振動、光により容易に線維を形成し、細胞毒性を示すことが明らかとなっている。さらに、ヒトインスリンがモノマーとして存在する酸性条件下で、線維化が生じやすいことが報告されており、ヒトインスリンの線維化機序は、通常 α ヘリックス構造をとるヒトインスリンのモノマーが誤った折りたたまれ方 (β シート構造)をし、それが複数集合して核を形成し、その核が成長するといった過程をとるとの考えが最も支持されている (Fig. 4) [45, 46, 58]。

アミロイド線維は、それを構成するタンパク質の種類に関わらず、共通した構造をとっており、 β ストランドが線維軸と垂直方向に積み重なったクロス β シート構造を有している[24, 59]。 β シート構造との相互作用により、蛍光を発するチオフラビン T (ThT) は、アミロイド線維と特異的に結合し[60]、蛍光顕微鏡下での観察や蛍光分光光度計での蛍光強度測定に、多くの研究で利用されている (Fig. 5)。

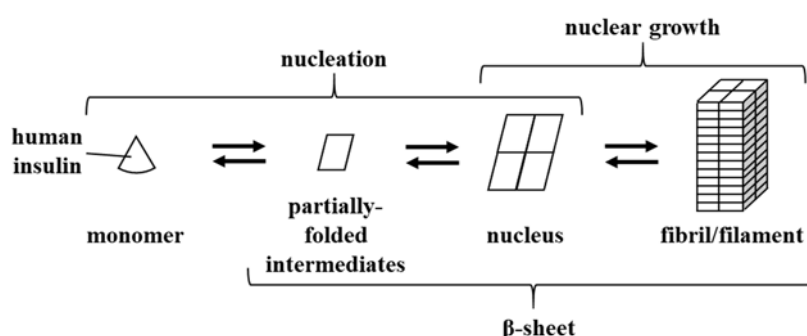


Fig. 4 Estimated fibril formation process of human insulin *in vitro*.

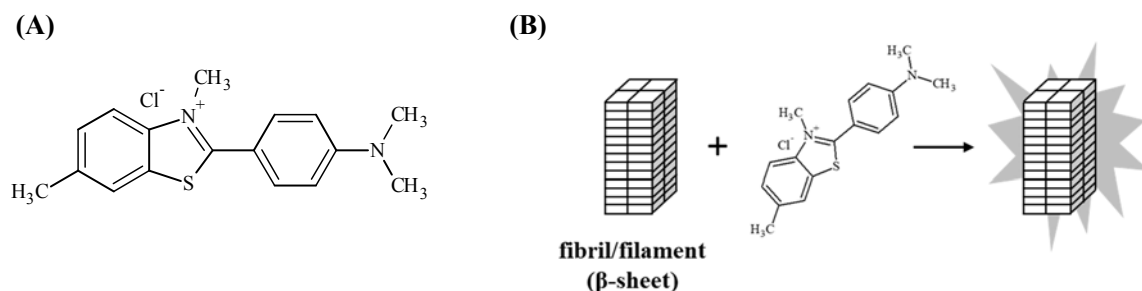


Fig. 5 (A) Structure of Thioflavin (ThT). (B) Schematic diagram of fluorescence enhanced by binding of amyloid fibril to β -sheet structure.

既存の研究の多くは、酸性条件下で、添加剤などの他の成分を取り除いて、ヒトインスリンの分子そのものを用いて行われている[44-57]。これは、ヒトインスリン分子の線維化に関して、分子機構を解明する観点から行われている方法であり、添加剤の存在は現象をより複雑化するため、排除する必要があると考えられてきた。しかし、ヒトインスリンの立体構造やその安定性には、亜鉛イオンや *m*-クレゾールなどの製剤中の添加剤が密接に関わっており、アミロイド線維形成に重要な役割を果たす可能性がある。実際に臨床で使用されているのは、ヒトインスリンの製剤であり、添加剤が含まれた状態である。したがって、ヒトインスリン分子そのものでなく、臨床で使用されている製剤中におけるヒトインスリンの線維化、つまり、添加剤を含めたヒトインスリンの線維化の評価が重要であると考えた。そこで本章では、ヒトインスリンの製剤であるヒューマリン®R[61]を用いて、ヒトインスリンの線維化とそれに及ぼす添加剤の影響を検証し、考察した。

本章ではまず、一般的に線維化は線維の形成の中心となる、いわゆる核の共存下で促進されることから[24]、線維化が生じにくい条件下で線維化結晶が共存した場合、その結晶が核として機能するかを評価した。それを評価するにあたって、ヒトインスリンの線維化が物理的刺激により進行することから、製剤をバイアルに入れて強い攪拌もしくはゆるやかに振盪させることで、線維化が生じやすい条件と生じにくい条件を設定した。

続いて、製剤中の添加剤の濃度変化や pH 変化の影響を考慮できるように、横型拡散セルを用いて、製剤から動的に添加剤が消失する実験系や pH が時間とともに変化する実験系を作製した上で、線維化に関わる要因を明らかにした。

第2節 ヒトインスリンの線維化における線維化結晶共存の影響

2-1. バイアルを用いた線維化試験の条件設定

ヒトインスリンの線維化は、高温への暴露や攪拌による物理的刺激によって容易に起こり[44-57]、核の共存下で促進されることから[24]、線維化が生じにくい条件下で線維化結晶が共存した場合、その結晶が核として機能するかを評価した。それを評価するにあたり、まず本研究において、線維化が生じやすい条件と生じにくい条件を設定するための予備実験を実施した。

ヒトインスリンの製剤であるヒューマリン®R をバイアルに入れ、37℃下で、強い物理的刺激として 850 rpm での攪拌、もしくは弱い物理的刺激として 30 rpm での旋回振盪を行った。線維化の進行は、濁度と ThT の蛍光強度により評価した。線維化が進行すると、不溶性タンパク質の増加から濁度が上昇するとともに、その不溶性タンパク質が線維であった場合、ThT の存在下で蛍光強度の上昇が観察される。弱い物理的刺激として 30 rpm で振盪した場合、濁度と ThT 蛍光は上昇せず、強い物理的刺激として 850 rpm で攪拌した場合、それらは上昇した (Fig. 6)。このことから、本研究では、30 rpm の振盪では線維化は促進せず、850 rpm の攪拌では線維化が進行すると条件付けられた。

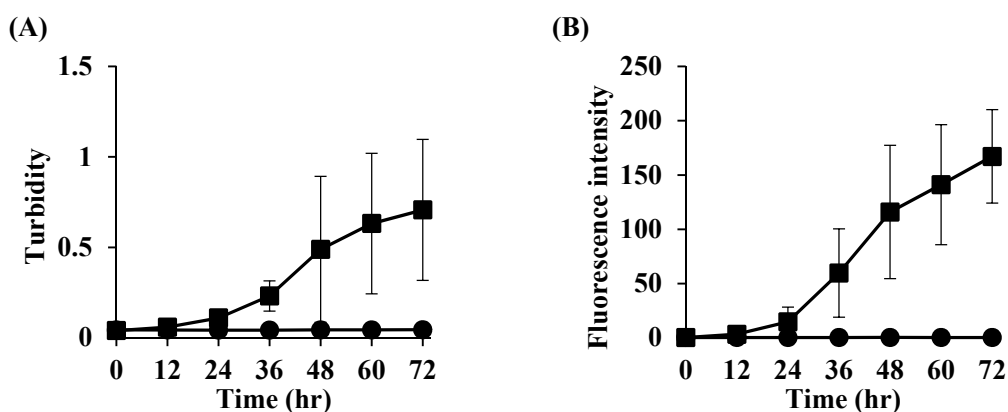


Fig. 6 The effect of physical stimulus in the experiments of simple mixing in the vials for Humulin®R.

Turbidity (A) and fluorescence intensity (B) at 30 rpm (●) and 850 rpm (■) were evaluated. Each value is expressed as the mean \pm standard deviation (S.D.) (n=3-5).

2-2. ヒトインスリンの線維化における線維化結晶共存の影響

2-1 で、線維化の促進が見られなかった 30 rpm において、線維化結晶を共存させ、その結晶が核として機能するかを評価した。まず、ヒューマリン[®]R を用いて、850 rpm であらかじめ、ヒトインスリンのアミロイド線維を形成させた (Fig. 7(A))。このアミロイド線維の一部を、ヒューマリン[®]R が入ったバイアルに添加し、30 rpm で巡回振盪させた (Fig. 7(B))。その結果、濁度と ThT の蛍光強度が速やかに上昇した (Fig. 8)。このことから、線維化結晶の存在により、線維化が進行しにくい 30 rpm でも、線維化結晶が線維核として働き、容易に核の成長、つまり線維化が進行したと考えられる。

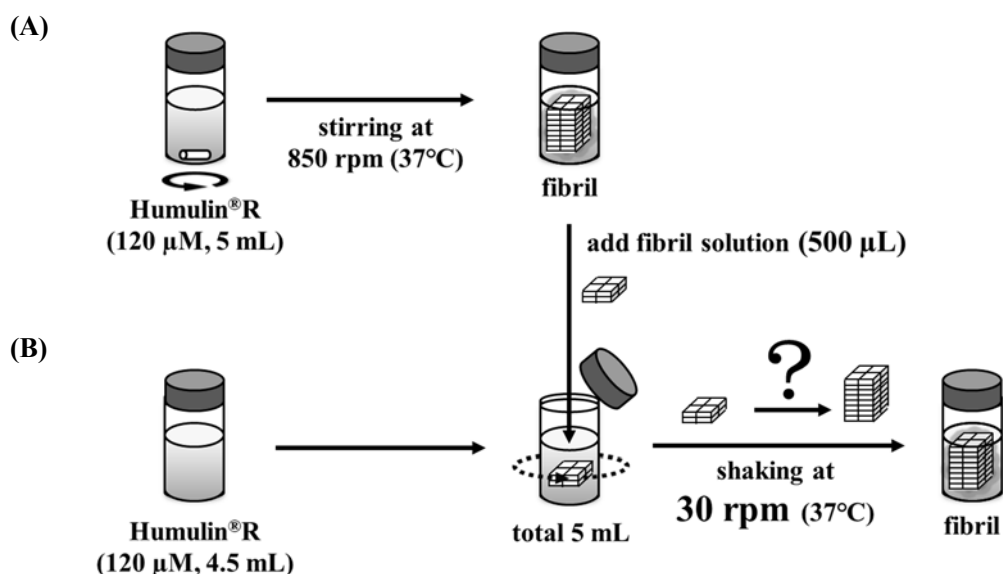


Fig. 7 Procedure of fibril growth experiments in the vials with the fibril crystals.

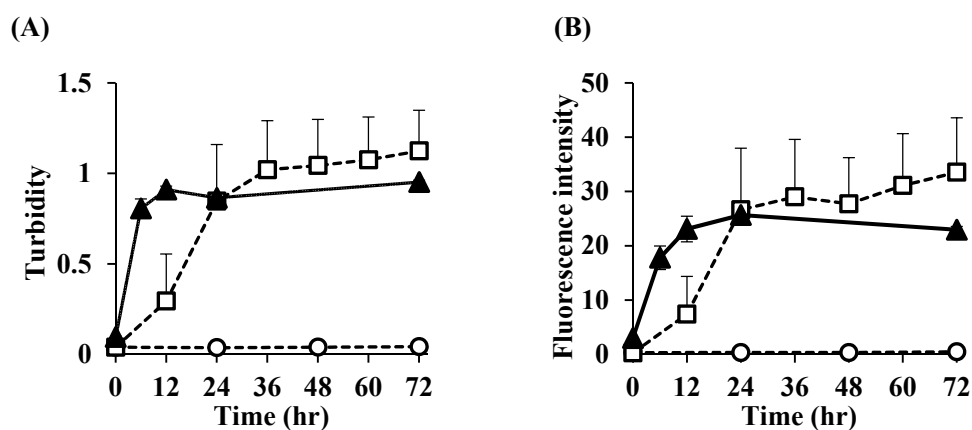


Fig. 8 Fibril growth experiments in the vials with fibril crystals.

At 30 rpm without fibril crystals (○), 850 rpm without fibril crystals (□) and 30 rpm with fibril crystals (▲) were evaluated. Each value is expressed as the mean \pm S.D. (n=3).

第3節 ヒトインスリンの線維化における製剤中添加剤とpHの影響

3-1. ヒトインスリンの線維化における希釈の影響

ヒューマリン®R 中の添加剤がヒトインスリンの線維化に及ぼす影響を評価するために、製剤をリン酸塩緩衝生理食塩液 (PBS, pH 7.4) で希釈して、850 rpm での線維化実験を行った。製剤を希釈することにより、ヒトインスリンや、製剤中添加剤である亜鉛イオンや *m*-クレゾールなどの濃度も一様に低下する。その低下率が一樣でも平衡の状態に変化が生じ、それぞれがヒトインスリンの立体構造に与える影響が異なる可能性がある。実験の結果、製剤を PBS で 5 倍に希釈した場合においても、濁度と ThT 蛍光の上昇が認められた (Fig. 9(A))。このことから線維化が進行したと考えられる。その間、pH の変化は認められなかった (Fig. 9(B))。

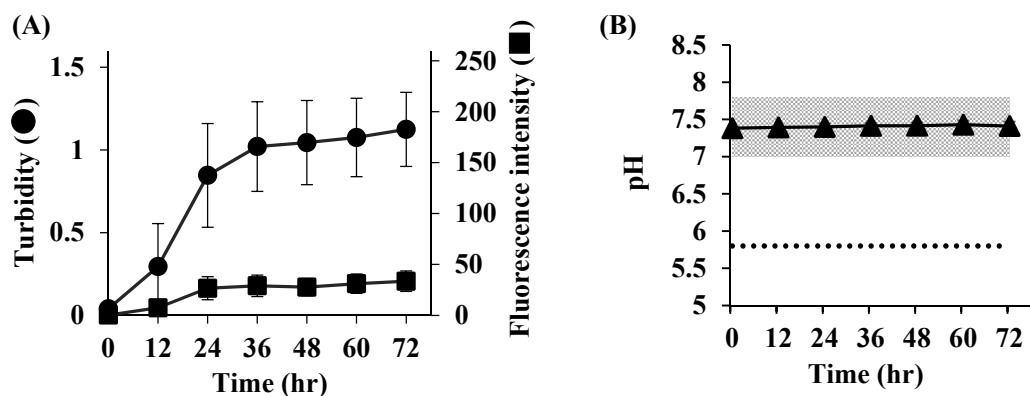
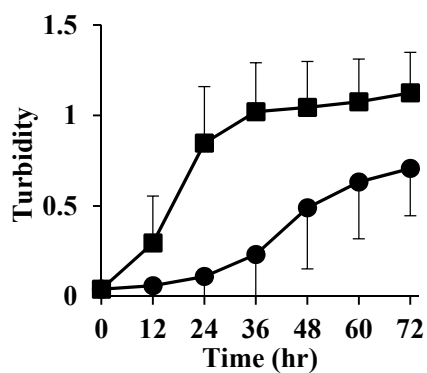


Fig. 9 The effect of dilution of Humulin®R in the experiments of simple mixing in the vials.

Humulin®R was diluted 5-fold with PBS (pH 7.4). Turbidity (●), fluorescence intensity (■), and pH (▲) were evaluated. The isoelectric point of human insulin in Humulin®R and the pH range in the original formulation of Humulin®R are expressed as a dotted line and filled area in grey. Each value is expressed as the mean \pm S.D. (n=3-5).

製剤原液と製剤を希釈した場合の濁度と ThT の蛍光強度を比較した結果を Fig. 10 に示した。線維化の指標である ThT の蛍光強度は、希釈によってヒトインスリン濃度が低下することにより、低下もしくは遅延すると予想された。しかし、希釈した系では、製剤原液に比べてヒトインスリン濃度が低下しているにもかかわらず ThT の蛍光強度の立ち上がり時間 (~24 hr) は変化せず、その値も、製剤原液と希釈製剤で有意な差は生じなかった。このことから、希釈によるヒトインスリンや添加剤の *m*-クレゾール、亜鉛イオンの濃度低下が、線維化を促進している可能性が推察された。また、濁度は粒子径に依存するため、両者の濁度の差異は生成した線維の大きさが異なるためだと考えられる。

(A)



(B)

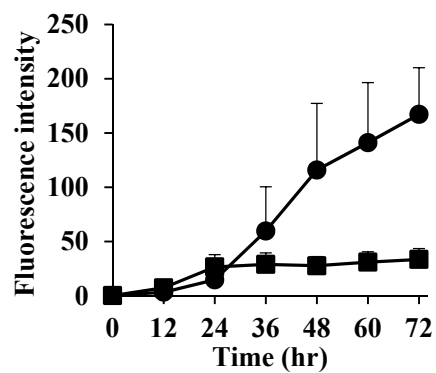


Fig. 10 Comparison of undiluted and diluted Humulin®R in the simple mixing experiments in the vials.

Humulin®R was undiluted (●) and diluted 5-fold with PBS (pH 7.4) (■). Each value is expressed as mean \pm S.D. (n = 6 -9).

3-2. ヒトインスリンの線維化における製剤中添加剤の影響

3-1 で、製剤を希釈することにより、線維化が促進している可能性が示された。これは、希釈により、ヒトインスリンや製剤中添加剤である亜鉛イオンや *m*-クレゾールなどの濃度低下が一様でも、ヒトインスリンの平衡状態に変化が生じたためだと考えられる。すなわち、ヒトインスリンや亜鉛イオン、*m*-クレゾールなどが、一様に希釈されても、それぞれでインスリンの立体構造に与える影響が異なっていたためと推察される。本節では、特に添加剤が希釈されていることに注目した。そこで、横型拡散セルを用いて、製剤から添加剤が動的に消失していく実験系を作製し、添加剤が線維化に及ぼす影響を評価した (Fig. 11)。

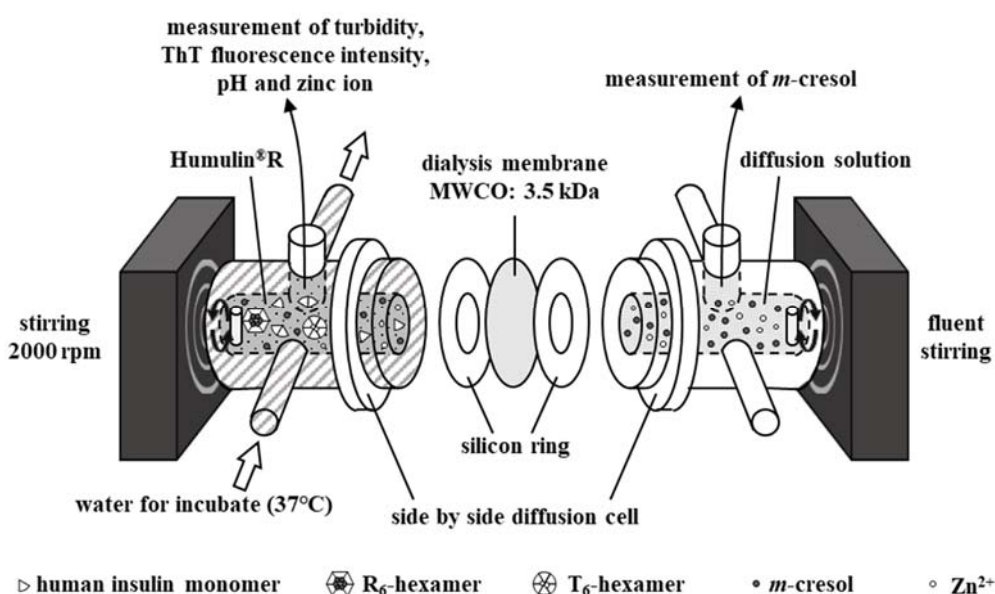


Fig. 11 An experimental system in which the composition of the formulation changes over time as the components permeate via the membrane.

2 つのセル間にヒトインスリンが透過しない透析膜 (分画分子量 (MWCO) : 3500) を挟み、そのセルの一方にヒトインスリンの製剤であるヒューマリン®R を入れ、もう一方には拡散溶液として、製剤から添加剤が消失していくように生理食塩液 (①)、もしくは、製剤から *m*-クレゾールの濃度が変化しないように、製剤と同濃度の *m*-クレゾールを添加した生理食塩液 (②) を入れた。

拡散溶液として、製剤から添加剤が消失していくように生理食塩液を用いた系 (①) で、拡散溶液側に透過してきた *m*-クレゾールの濃度を測定し、製剤側に残存している *m*-クレゾールを算出した。その結果、*m*-クレゾールは 72 時間で 20% 程度の残存率まで消失していた (Fig. 12)。消失に伴い、濁度と ThT の蛍光強度が上昇したことから (Fig. 13)、線維化が進行したと考えられる。一方、拡散溶液として、製剤から *m*-クレゾールが消失しないように、製剤と同濃度の *m*-クレゾールを添加した生理食塩液を用いた系 (②) では、72 時間の実験中で *m*-クレゾールが消失していないことが確

認された (Fig. 12)。また、*m*-クレゾールが消失する①に比べて、濁度と ThT の蛍光強度の上昇が遅延した (Fig. 13)。このことから、*m*-クレゾールは、線維化に抑制的に働いたと考えられる。

このときのそれぞれの系での亜鉛イオンの挙動を解析するために、72 時間の時点での製剤側の亜鉛イオン濃度を測定するためだけの実験をそれぞれの系で単独で行った。その結果、*m*-クレゾールの消失が確認された①では、亜鉛イオンが 20%程度しか消失していなかった (Fig. 14)。一方、*m*-クレゾールの消失が確認されなかった②では、拡散溶液側には製剤と同濃度の *m*-クレゾールのみしか存在していないにも関わらず、亜鉛イオンはほとんど消失しておらず、亜鉛イオンの消失が抑制されていた (Fig. 14)。すなわち、*m*-クレゾールが拡散溶液側に存在し、製剤側から消失しないことで、亜鉛イオンの製剤側からの消失が抑制されたと言える。このことから、*m*-クレゾールが亜鉛イオンの消失を制御し、亜鉛イオンの消失は *m*-クレゾールの消失により起こりやすくなると考えられる。

以上の結果をまとめると、製剤から *m*-クレゾールが消失しない系 (②) では、亜鉛イオンの消失がほとんど起こらず、*m*-クレゾールと亜鉛イオンの存在下でヒトインスリンの会合状態の平衡は R₆ ヘキサマー側に傾いており、R₆ ヘキサマーとして安定化されていることで線維化が抑制され (Fig. 15 (B))、製剤から *m*-クレゾールと亜鉛イオンが消失していく系 (①) では、*m*-クレゾールの消失により T₆ ヘキサマーとなったヒトインスリンが、*m*-クレゾールの消失に次いで、T₆ ヘキサマーから亜鉛イオンの解離が促進されることで亜鉛イオンが消失し、それによる平衡の変化によって、線維化が進行したと考えられた (Fig. 15 (C))。

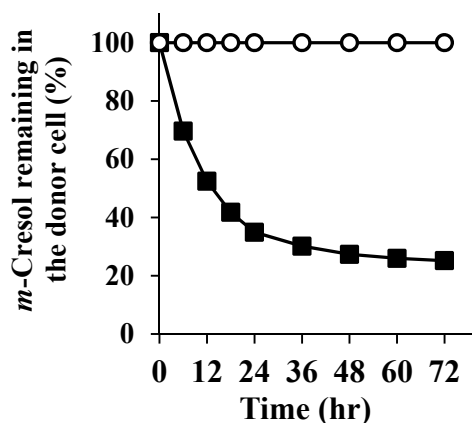


Fig. 12 Calculated *m*-cresol remaining in the Humulin®R cell in experiments saline (■, ①) and saline + *m*-cresol (○, ②).

The cumulative amount of *m*-cresol permeated through the membrane into the other side cell was used for the calculation. Each value is expressed as the mean \pm S.D. (n=5-6).

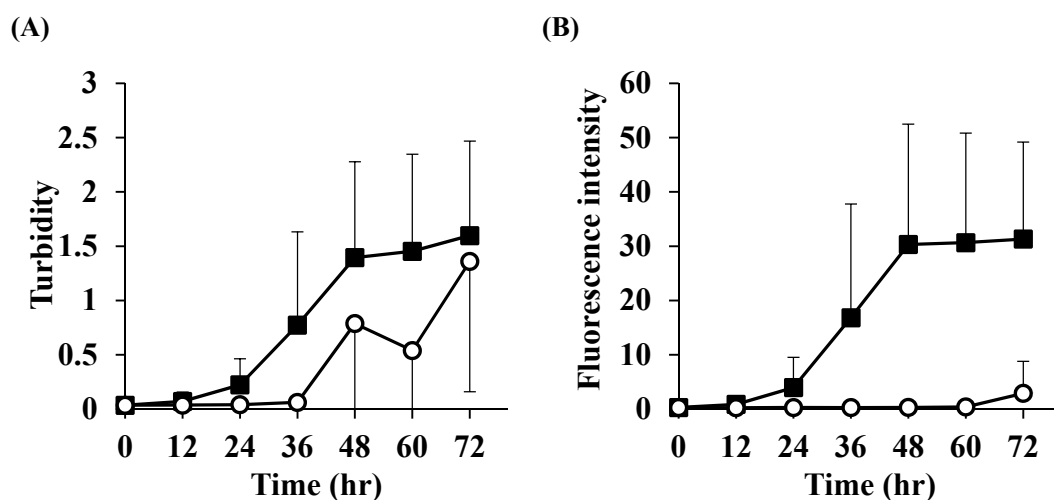


Fig. 13 Turbidity and ThT fluorescence intensity in the experiments using side-by-side diffusion cell for Humulin®R.

Saline (■, ①) and saline + *m*-cresol (○, ②) were applied to the diffusion solution cell. Each value is expressed as the mean \pm S.D. (n=3-6).

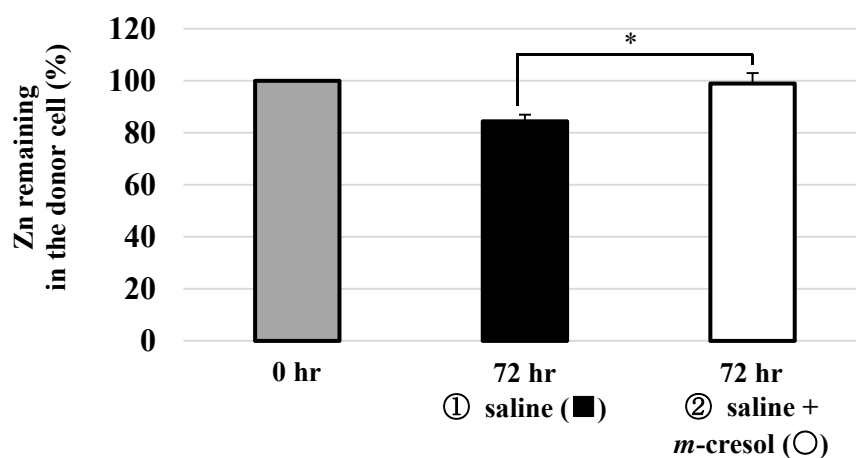


Fig. 14 Zinc ion remaining in the Humulin®R cell in experiments saline (■, ①) and saline + *m*-cresol (○, ②).

The zinc ion concentration in the cells containing the formulation was measured 72 hr after the end of the experiment. Each value is expressed as the mean \pm S.D. (n=5-7); * $P < 0.05$ at 72 hr, calculated using Student's t-test.

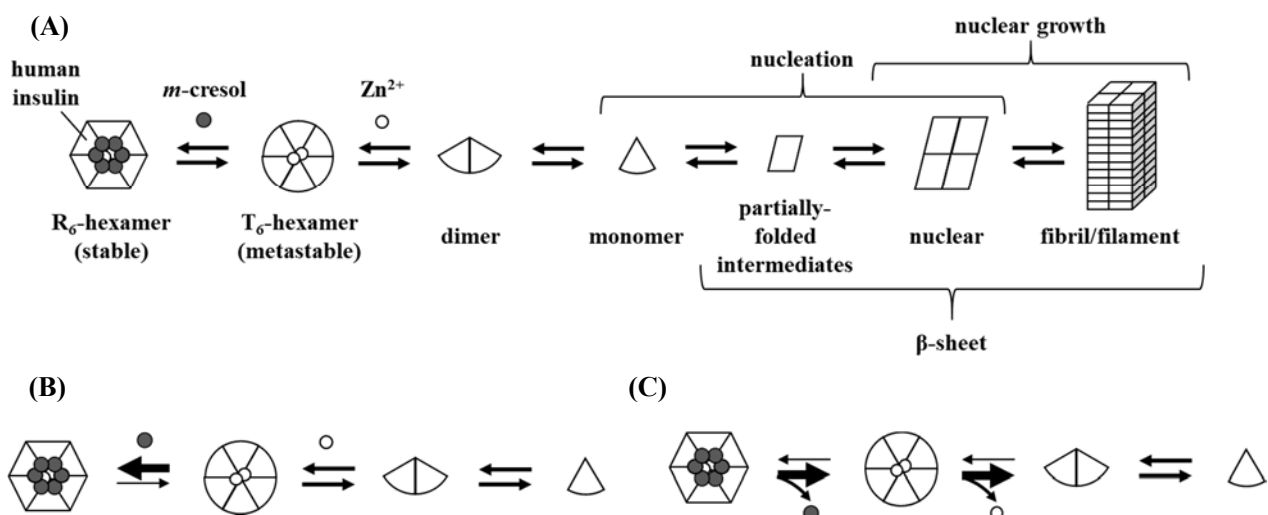


Fig. 15 Proposed fibril formation process of human insulin with consideration of additives (A). When cresol does not disappear, equilibrium leans toward steady state (B), but when cresol disappears, the equilibrium tilts in the direction of metastable system, dissociation into monomer (C).

また、拡散セルを用いた実験は非平衡な系であるため、局所的な濃度変化が生じる。製剤から *m*-クレゾールと亜鉛イオンが消失していく系(②)では、添加剤が消失していく界面である膜近傍でゲルが生じた (Fig. 16)。このゲルは ThT に高い応答を示したことから、アミロイド線維を含んでいると考えられた。すなわち、部分的に生じたヒトインスリンを含む添加剤などの各成分の濃度変化や周囲環境の変化が、アミロイド線維の形成を誘発することが示唆された。*In vivo* の注射部位でも、各成分の拡散や体液による希釈によって同様な変化が生じると考えられ、治療を受けている患者の皮下においてアミロイドーシスが生じる際も、同様な現象が引き金となっている可能性がある。

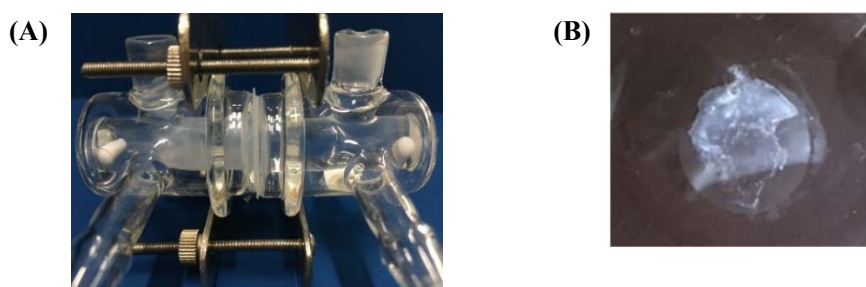


Fig. 16 The side view of the cell set at the end of the experiment (A) and a photograph of the gel generated (B).

The gel generated on the membrane donor side when otsuka normal saline was applied to the other side cell (①).

Table 3 ThT fluorescence of generated gel.

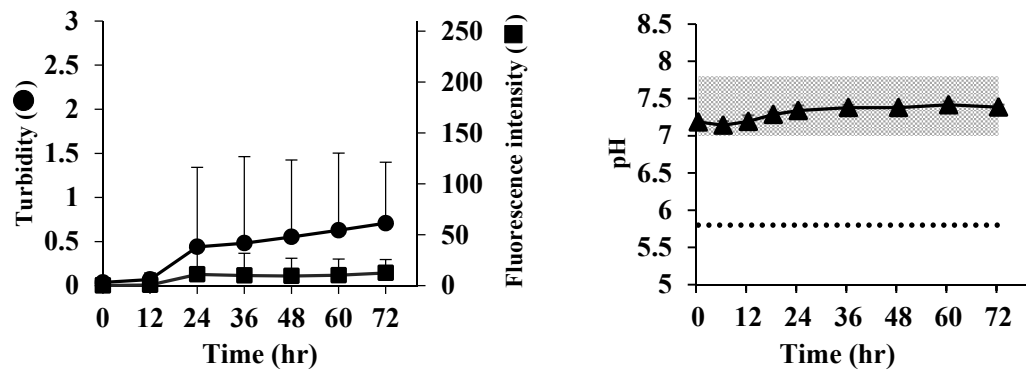
	solution	gel
ThT fluorescence intensity	47.0	268.6

3-3. ヒトインスリンの線維化における製剤中 pH の影響

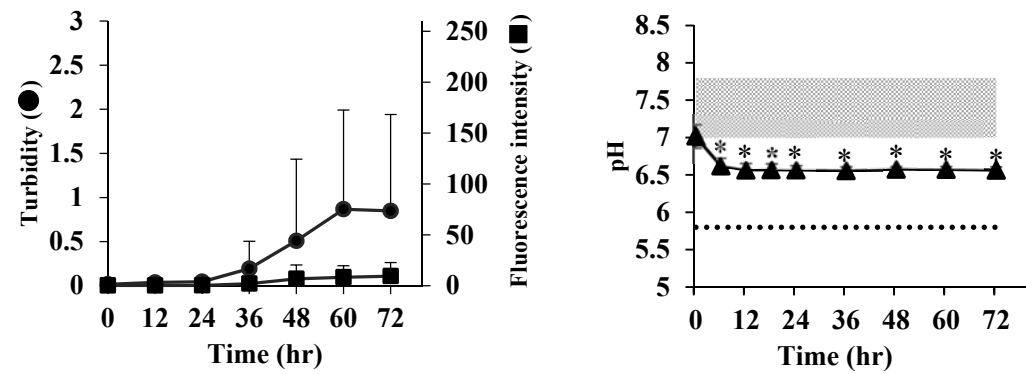
ヒトインスリンは酸性条件下で、モノマーとして存在することから、既存の研究の多くは、酸性条件下で実験を行っている[44-57]。ヒトインスリンの等電点は pH 5.8 であり[61]、ヒューマリン[®]R の pH は約7であるが[61]、pH が変化した場合の線維化への影響についても興味をもたれる。特に、ヒューマリン[®]R の pH に対する規格は、pH 7.0~pH 7.8 であり[61]、保存中に pH が変化してしまう製剤もあると考えられる。製剤中 pH の酸性化に伴って生じ得る等電点沈殿物の析出と線維化の関係性を評価するために、Fig. 11 の実験システムの拡散溶液に、pH を pH 7.4、pH 6.5、pH 5.5 に調整した PBS を入れ、経時的に pH が酸性化する系を作製した。

それらの結果を Fig. 17 に示す。Fig. 17(A) に示した pH 7.4 と、Fig. 17(B) に示した pH 6.5 では、濁度の上昇に伴う ThT の蛍光強度の上昇が見られ、それらの挙動は類似していた。一方、Fig. 17(C) に示した pH 5.5 の条件では、pH が等電点まで低下していくにつれて、濁度は増加したが、ThT の蛍光強度は増加しなかった。これは、等電点付近での析出物が中性 pH での析出物とは異なり、析出物が線維ではないことを意味する。すなわち、中性付近の pH では線維化が進行しやすく、等電点付近の pH では、線維化よりも等電点沈殿物の析出が起こると思われる。

(A) pH 7.4



(B) pH 6.5



(C) pH 5.5

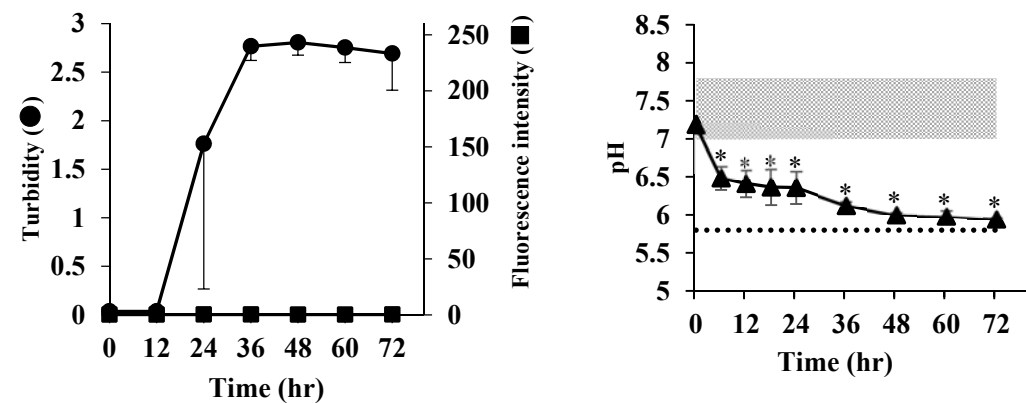


Fig. 17 Experiments using side-by-side diffusion cells for Humulin®R.

PBS (pH 7.4) (A), PBS (pH 6.5) (B), and PBS (pH 5.5) (C) were applied to the other cell. Turbidity (●), fluorescence intensity (■) and pH (▲) were evaluated. The isoelectric point of human insulin in Humulin®R and the pH range of the original formulation of Humulin®R are expressed as a dotted line and filled area in grey. Each value is expressed as the mean \pm S.D. ($n=3-6$). Significantly lower pH value (*) than the lower standard pH value of Humulin®R (* $P < 0.05$).

第4節 小括

ヒトインスリンの線維化は、物理的刺激により促進されることは知られているが、*in vitro* でバイアルを用いて行った本研究では、30 rpm での振盪では線維化が生じず、850 rpm での攪拌では、速やかな線維化が観察された。しかし、線維化結晶の共存により、攪拌強度が弱い 30 rpm の条件においても、線維化が進行し、線維化結晶が核として機能することが明らかとなった。

ヒトインスリンの製剤であるヒューマリン®R を PBS (pH 7.4) で希釈すると、線維化が促進された。その要因を解析するために、横型拡散セルを用いて、製剤から動的に添加剤が消失する実験系を作製した。その結果、ヒューマリン®R 中の *m*-クレゾールは、線維化に抑制的に働くこと、亜鉛イオンの消失は *m*-クレゾールの消失により起こりやすくなることを明らかにした。*m*-クレゾールと亜鉛イオンの存在下では、ヒトインスリンは R₆ ヘキサマーとして安定化されていることで線維化が抑制され、*m*-クレゾールの消失に次ぐ亜鉛イオンの消失により、T₆ ヘキサマーとなり、徐々にモノマーへと解離したことで線維化が進行したと考えられる (Fig. 15)。したがって、亜鉛イオンや *m*-クレゾールなどは、製剤の保存中における線維化抑制において重要な役割をはたしていると考えられる。

製剤から動的に添加剤が消失する拡散セルの実験系で、*m*-クレゾールなどの物質移動が起きている膜近傍でゲルが生じた。このゲルはアミロイド線維を含んでいた。この現象は、ヒトインスリンを含む各成分の局所での濃度変化や周囲環境の変化が、アミロイド線維の形成を誘発することを示唆している。*In vivo* の注射部位でも、各成分の拡散や体液による希釈によって同様な変化が生じると考えられ、治療を受けている患者の皮下においてアミロイドーシスが生じる際も、同様な現象が引き金となっている可能性があることが考えられた。また、等電点沈殿物の析出と線維化の関係を評価するために、経時的に pH が酸性化する系を作製した。その結果、中性付近の pH では線維化が進行しやすく、等電点付近の pH では線維化よりも等電点沈殿物の析出が起こると考えられた。

第2章 インスリンの化学構造の違いによる線維化の比較

第1節 小緒言

第1章の結果から、ヒトインスリンはヘキサマーとして安定化して存在していると、線維化が抑制されることが示唆された。この結果から、モノマーで存在すると変性し、線維化が起こりやすくなることが推察される。このことから、モノマー含量が多い条件で線維化は促進されと考えられるが、一方で、モノマー自体が β 構造に変化して、積層していく過程も重要であると考えられる。すなわち、IDAやインスリンボールの要因を考える上で、ヘキサマーからモノマーが生じる過程と、モノマーが β 化する過程の2つに分けて理解を進めることが必要であると考えられる。

近年のインスリン治療の主体は、インスリンアナログ製剤が開発されたことで、ヒトインスリンからインスリンアナログへとシフトしている。糖尿病患者のインスリン分泌動態の障害の程度は患者によって様々であるが、インスリンアナログ製剤の登場により、患者個々のインスリン分泌動態やそれぞれのライフスタイルにあった治療を行うことが可能となった[3]。しかし、インスリンアナログ製剤においても、臨床においてインスリンボールが生じることが明らかとなっている[6, 8, 9, 11-13, 15, 16, 18, 19]。

インスリンアナログ製剤は作用発現の時間から、超速効型インスリン製剤と持効型インスリン製剤に分類される。超速効型インスリン製剤は、ヒトインスリンのアミノ酸配列の置換により、主に、皮下投与後に、ヘキサマーからモノマーへの解離が速くなるように設計されている。一方、持効型インスリン製剤は、ヒトインスリンに塩基性アミノ酸の修飾や一部を欠損させた上での脂肪酸の修飾により、皮下投与後の吸収が緩徐になるように設計されている。これらのインスリンアナログ製剤は、製剤によって化学構造や添加剤の種類が異なっている(Fig.18, Table 4)。したがって、インスリンアナログ製剤間の線維化のしやすさは、化学構造や添加剤の違いによるヘキサマーの安定性の違いや、生じたモノマー自身の β 構造への変換に対する耐性の違いが要因として関わっていると考えられる。このことから、各種製剤間の線維化のしやすさを比較し、またその原因について考察することは重要である。

超速効型インスリン製剤は、インスリンポンプでの使用が許可されており、ポンプ内やルート内での析出が問題視されている[62, 63]ことから、超速効型インスリンアナログの線維化に関する研究は多く行われている[62, 64]。一方、持効型インスリン製剤は現在3つの製剤が上市されているが、線維化に関する研究は少ない。B鎖C末端へのアルギニンの付加により等電点をヒトインスリンよりも中性化させ、皮下で等電点沈殿物を形成するインスリングルゲン(製剤名; ランタス®)[65]、B鎖C末端を欠損させ、B鎖29位のリジン残基にミリスチン酸を修飾し、アルブミンとの結合能を獲得させたインスリンデテミル(製剤名; レベミル®)[66]、B鎖C末端を欠損させ、B鎖29位のリジン残基にグルタミン酸を介してヘキサデカン二酸を修飾し、アルブミンとの結合能の獲得に加え、皮下でマルチヘキサマーを形成するインスリンデグルデク(製剤名; トレーバ®)[67]が上市されている(Fig. 18, Table 4)。これらの製剤が持つ、皮下での沈殿物の形成や、ダイヘキサマー、マルチヘキサマーを形成するといった特性から、持効型インスリン製剤の線維化の程度を比較検討するこ

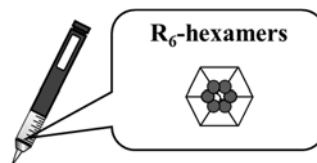
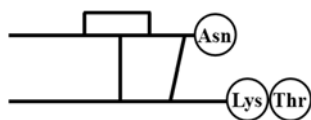
とは意義があると考えられる。このことから、本章では、インスリンアナログとして、持効型インスリン製剤に主に焦点を当てて検討を行った。

第 1 章の結果から、ヒトインスリンの線維化抑制においては、ヘキサマーとしての安定性が鍵となることが示唆された。持効型製剤の中には、他の製剤とは異なる会合状態で保存されているものがあり、レベミル®やトレシーバ®は、製剤中ではダイヘキサマーを形成していることが分かっている[66-68]。本章では、製剤中での会合状態やモノマーの化学構造の違いに着目し、円二色性測定により会合状態を評価しつつ、線維化のしやすさを比較した。

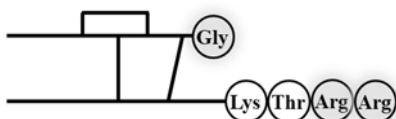
また、第 1 章の結果から、ヒトインスリンの線維化は、ヒトインスリンの線維核の共存によって、物理的刺激が弱い条件でも促進されることが明らかとなったため、ヒトインスリンと持効型インスリンという異種分子間においても、核の共存による線維化の促進が起こるかを *in vitro* と *in vivo* の両方の系で評価した。速効型であるヒトインスリンと同様の核成長反応が起こらない場合、持効型製剤に切り替えることは、線維化の進行や、IDA およびインスリンボールの形成抑制に有効となるといえる。

さらに、本章では、インスリンの化学構造と線維化の関係を明確にし、IDA を生じない製剤の開発につなげるため、新規ヒトインスリン誘導体を合成して、検討を行った。導入する官能基としては、フェニルボロン酸(PBA)を選択した。PBA をヒトインスリンに修飾したフェニルボロン酸修飾インスリン(PBA-Ins)は、ボロン酸を有することで、皮下において細胞表面糖鎖と相互作用し、細胞内に取り込まれて消化され、*in vivo* でアミロイドーシスを生じないことが期待できる。

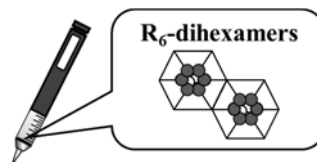
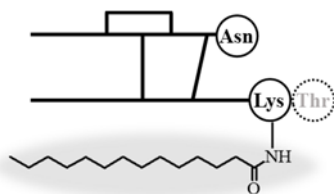
(A) human insulin



(B) insulin glargine



(C) insulin detemir



(D) insulin degludec

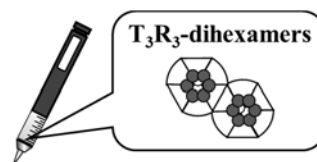
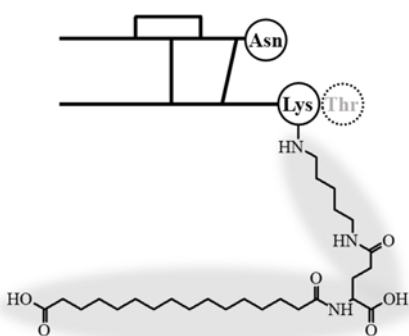


Fig. 18 Structure of human insulin and long-acting insulins and the aggregation state in the formulations.

Table 4 Composition and behavior in long-acting insulin.

Type	Formulation name [company]	Main medication [MW]	Conc. (μ M)	pH	pI	Zinc (mg) [65.38]	<i>m</i> -Cresol (mg) [108.14]	Phenol (mg) [94.11]	Glycerin (mg) [92.1]	100 IU/mL	
										Other additives [MW]	
Short-acting	Humulin®R [Eli Lilly]	Human insulin [5807.6]	600	7.0-7.8	5.8	0.015	2.5	—	16.0	pH regulator	
Long-acting	Lantus® [Sanofi Aventis]	Insulin glargine [6062.9]	600	3.5-4.5	6.7	0.030	2.7	—	20.0	Polysorbate 20 0.02 mg [1227.72] pH regulator	
	Levemir® [Novo Nordisk]	Insulin detemir [5916.8]	2400	7.2-7.6	5.1	0.0654	2.06	1.80	16.0	Disodium hydrogen phosphate dihydrate 0.89 mg [177.99] Sodium chloride 1.17 mg [58.44] Hydrochloric acid [36.5] Sodium hydrate [40.0]	
	Tresiba® [Novo Nordisk]	Insulin degludec [6104.0]	600	7.2-8.0	—	0.0327	1.72	1.50	19.6	Hydrochloric acid [36.5] Sodium hydrate [40.0]	

第2節 持効型インスリン製剤の線維化の比較

2-1. レベミル®の繰り返し投与による *in vivo* での線維化

臨床でのインスリンボールの報告は、インスリンの使用歴が10年以上であることが多いが[12, 15, 16]、それは発見時における使用年数であり、どの時点でインスリンボールが形成されたかは不明である。ヒトインスリンを6週間、マウスに皮下投与することで、ヒトインスリンのアミロイド線維の皮下沈着が認められた報告があることから[26]、10数年という長期間でなくとも、インスリンにおいてインスリンボールが形成される可能性がある。そこで本節では、持効型インスリン製剤での線維化を比較するうえで、持効型インスリンでも、ヒトインスリンと同様に、実験動物において短期間でアミロイドーシスが生じるのかを検討した。自身の以前の予備的な実験結果から、アミロイドーシスが最も生じると予想されたレベミル®を用いて、ラットの背部の同一部位に繰り返し皮下投与を行った。

レベミル®(120 nmol/50 µL/body)を1日1回3週間とPBS(50 µL/body)を1日1回2週間、背部の同一部位に皮下投与したラットをイソフルラン麻酔下で大動脈切断により脱血した。その後、背部の皮膚を切り、投与部位を摘出した。摘出後、投与部位を撮影し(Fig. 19(A, B left side))、ThT(100 µM)に一晩浸漬した後、暗所で365 nmの蛍光を照射した状態で再度撮影した(Fig. 19(A, B right side))。PBS投与部位ではThT応答は見られなかったのに対し、レベミル®投与部位ではThT応答が見られた。このことから、レベミル®の製剤原液を皮下投与したことで、アミロイドーシスが生じたことが示唆され、持効型インスリン製剤についても、ヒトインスリンと同様に、実験動物において短期間でアミロイドーシスが生じることが明らかとなった。そのため、他の持効型インスリン誘導体の線維化についても、広く検討することにした。

(A) PBS



(B) Levemir®

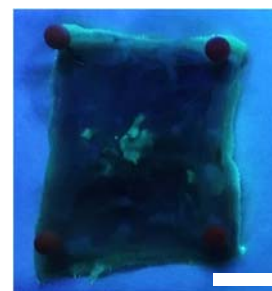
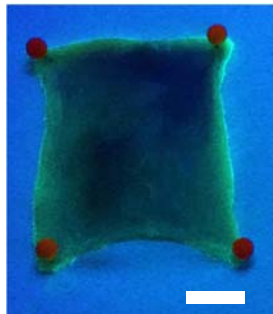


Fig. 19 Amyloidosis by repeated injections of Levemir®.

(A) is PBS injection site and (B) is Levemir® injection site. The left is no treatment and the right is soaked in ThT. Scale bar = 1 cm.

2-2. 持効型製剤の線維化の比較

2-1 において、レベミル®を、同一部位に 3 週間皮下投与することで、アミロイドーシスが生じることが明らかとなり、他の持効型インスリンの線維化に関しても広く検討する必要があると考え、本節では、各種持効型製剤の *in vitro* における線維化を比較した。

各種持効型製剤の原液をバイアル中で 37℃下、850 rpm で撹拌した。全ての製剤で ThT の蛍光強度の上昇が見られた (Fig. 20)。しかし、トレシーバ®のみ、撹拌前から ThT の蛍光が観察され、製剤を保存している状態で β 構造が存在していることが示唆された (Fig. 20, 0 hr)。

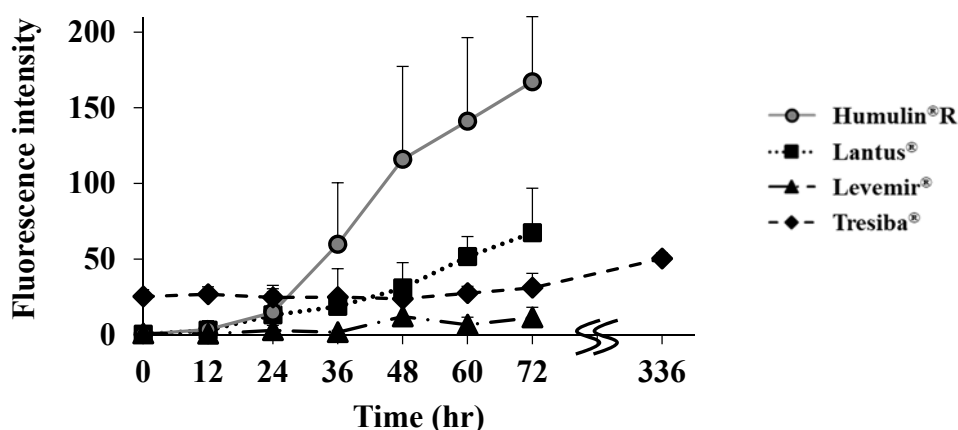


Fig. 20 Fibril formation experiment of the long-acting insulin in the vial.

All formulations were stirred at 850 rpm in the vials. Each value is expressed as the mean \pm S.D. (n=6-9).

そこで、製剤中の構造解析 (α/β) をラマン分光法を用いてラマン散乱を測定することで解析した。ラマン分光測定では、分子の振動エネルギーから、その分子の構造を判別できる。全製剤を原液の状態凍結乾燥し、その凍結乾燥品のラマン分光測定を行った。結果、どの製剤も同一のスペクトルで、 α ヘリックス構造に特徴的なピークを有していた [69, 70] (Table 5, Fig. 21)。このことから、トレシーバ®の、初期 ThT 応答は β シート構造 (線維) 由来ではないことが示された (Fig. 21)。

Table 5 Structural analysis of the long-acting insulin formulations using Raman spectra.

	α	β
C=O (amide □)	1659 cm ⁻¹	1674 cm ⁻¹

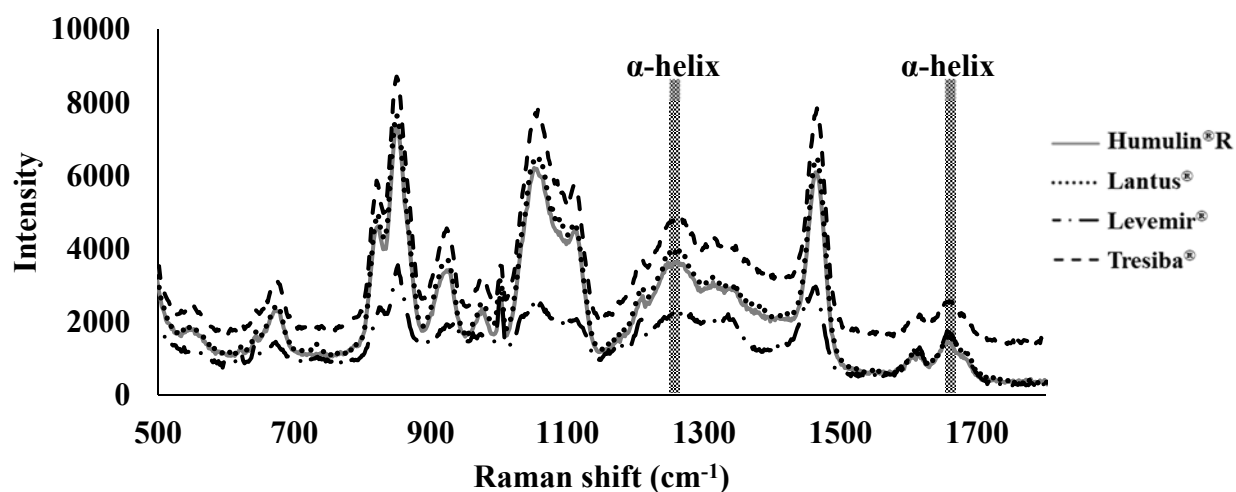


Fig. 21 Raman spectra of freeze-dried powder for the long-acting insulin formulations.

次に、それぞれの製剤中で 850 rpm で攪拌により析出してきた固体についてラマン分光測定を行った。ヒューマリン®R、ランタス®、レベミル®においては 72 時間、トレシーバ®においては 336 時間の攪拌後、バイアル中の懸濁溶液を遠心分離することで固体を得て、その固体を測定した。結果、全ての製剤において、析出固体は β シート構造を有していた (Fig. 22)。また、その線維化速度は、Fig.20 に示した ThT の蛍光強度の立ち上がりから、ヒューマリン®R > ランタス® > レベミル® >> トレシーバ®の順に早かった。

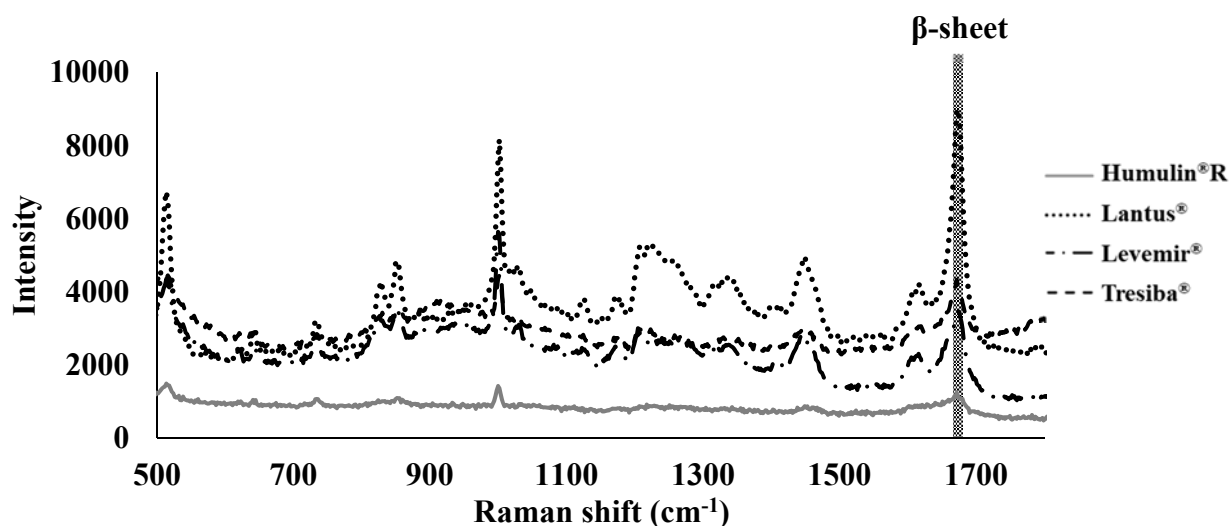
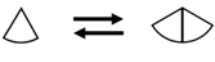
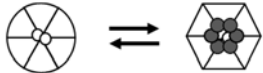



Fig. 22 Raman spectra of precipitated solid in the vial experiment.

線維化速度の違いの要因は持効型インスリンの会合状態が関係していると考え、円二色性(CD)測定により、会合状態を解析した。CDは、不斉な環境の影響を受けた発色団が引き起こす現象で、CD曲線を解析することで、タンパク質などの生体高分子の高次構造に関する情報を得ることができる。208/222 nmの負のピークの比率の増加はモノマーの増加を、251 nmの負のピークが大きいほどヘキサマーの平衡状態がT₆からR₆に傾いていることを、276 nmの負のピークが大きいほどダイマーやヘキサマーなどの会合体が形成されていることを、それぞれ意味する(Table 6)[71, 72]。

Table 6 Association state obtained from CD measurement.

208 nm /222 nm	251 nm	276 nm
 monomer dimer	 T ₆ -hexamer R ₆ -hexamer	 monomer dimer aggregate

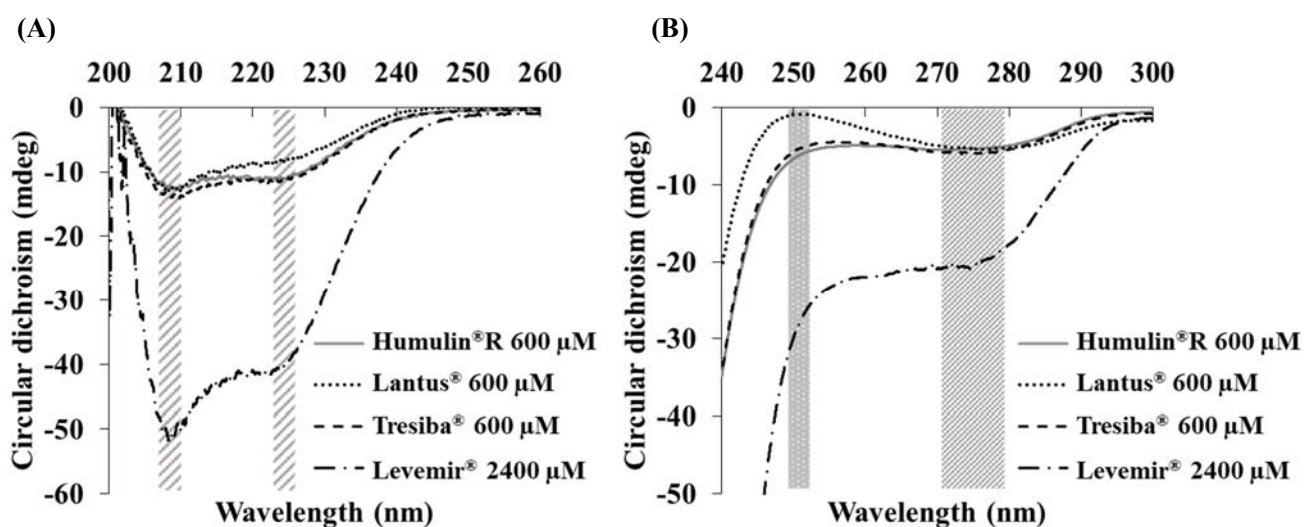


Fig. 23 Conformational analysis of the long-acting insulin formulations by CD spectra.

Table 7 CD spectra value of the long-acting insulin formulations.

	208 nm /222 nm	251 nm	276 nm
Humulin®R	1.130228	-5.80627	-5.19118
Lantus®	1.465421	-0.89729	-5.38515
Levemir®	1.247367	-26.4256	-19.3628
Tresiba®	1.177805	-5.02252	-5.82371

CD 測定の結果、モノマーの比率は、ランタス® > レベミル® > トレシーバ® ≥ ヒューマリン®R の順に多いことが示された (Fig. 23, Table 7)。また、ヘキサマーの安定性については、ランタス® < ヒューマリン®R < トレシーバ® < レベミル®の順に向上することが示された (Fig. 23, Table 7)。

等電点を中性化したランタス®の主薬であるインスリングラルギンは、製剤中での溶解性を保つことを目的に、製剤中 pH が他の製剤と比較して酸性化しているため、解離状態も他の製剤中のインスリンアナログと異なっている。それらの影響、すなわち各分子の解離基の状態の違いも考慮しなければならないが、単純に Fig. 20 と Table 7 の結果を比較すると、モノマーが多いと線維化が速くなると推察される。*m*-クレゾールや亜鉛イオンの存在により、製剤中でインスリンがダイヘキサマーを形成しているレベミル®やトレシーバ®では、線維化が遅い傾向にあることが示された (Fig. 24)。ヒューマリン®R は、モノマーの比率が最も低いにも関わらず、線維化は速かった。また、トレシーバ®の線維化はモノマーの割合がヒューマリン®R と同程度であったが、線維化は著しく遅く、線維化の速さはモノマーの割合だけでは説明ができず、ヘキサマーだけでなく、モノマー自体のβ構造への変化のしやすさも考慮する必要があると考えられた。

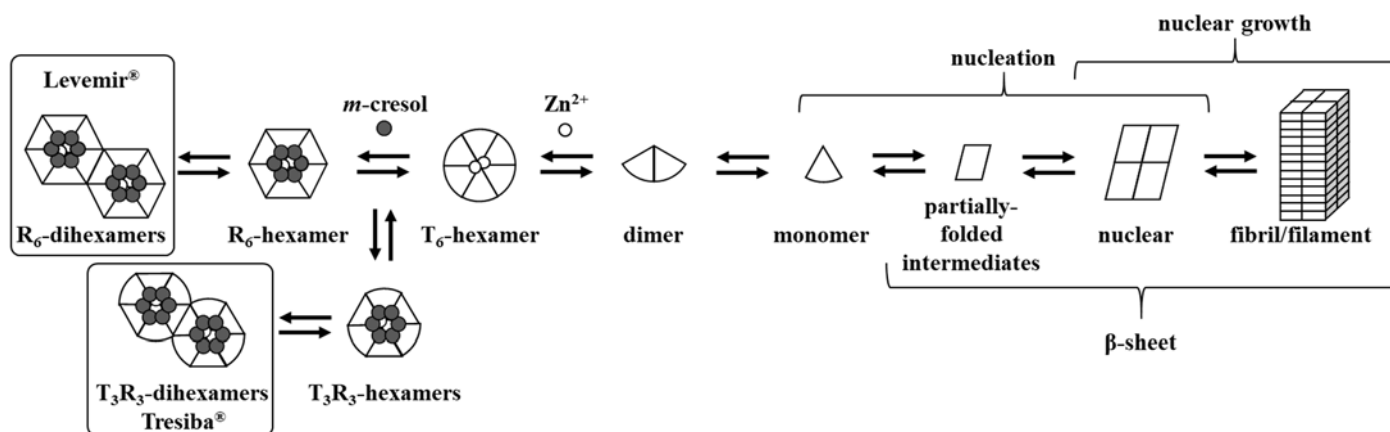


Fig. 24 Expected process fibril formation of the long-acting insulin.

2-3. インスリンデグルデクの線維化試験

In vitro で線維化が著しく遅かったトレシーバ®に関して、トレシーバ®の線維化に対する耐性が、製剤中で添加剤の存在により製剤中のインスリンデグルデクが安定なダイヘキサマーを形成することによるものなのか、インスリンデグルデク自体がモノマーでも β 化しにくい性質を有することによるものかを判断するために、トレシーバ®から添加剤を抜いた状態で線維化を評価した。また、実際に *in vivo* で投与された場合は、製剤の希釈によりインスリンデグルデクの平衡が変化するため (Fig. 25)、添加剤の存在下と非存在下で、線維化に違いが生じるかを比較検討することは重要である。インスリンデグルデクは製剤中ではダイヘキサマーを形成しているが、皮下投与後は *m*-クレゾールの拡散により、マルチヘキサマーを形成する。その後、亜鉛イオンの拡散により、マルチヘキサマーからヘキサマー、ダイマー、モノマーへと解離が進み、吸収されるという特性を有していると考えられている[67]。

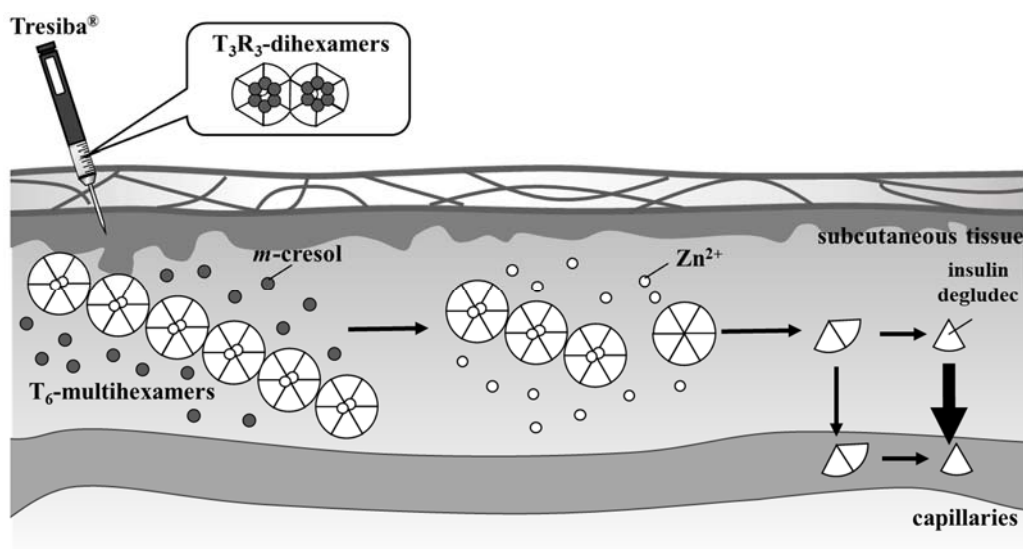
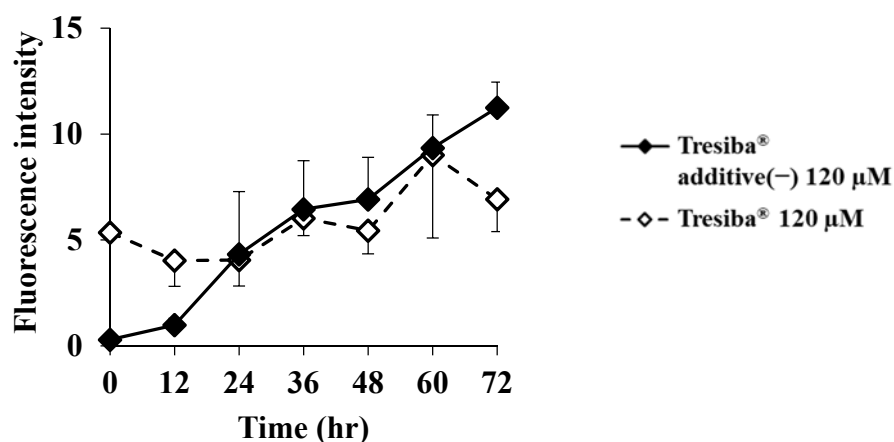


Fig. 25 Absorption process of Tresiba® after administered subcutaneously.

トレシーバ®から添加剤を除去すると、12時間からThTの蛍光強度の上昇が見られ (Fig. 26(A))、そのときの析出固体は β シート構造を有していた (Fig. 26(B))。このことから、トレシーバ®においても、そのモノマーであるインスリンデグルデクとなると線維化が生じやすく、トレシーバ®での線維化への耐性は、添加剤の存在による安定なダイヘキサマーの形成に起因することが明らかとなった。

さらに、トレシーバ®から添加剤を除去したことで、製剤で観察されていた初期の ThT 応答が消失した。このことから、ThT は製剤中のインスリンデグルデクのダイヘキサマーに応答して蛍光を発する性質があり、添加剤の除去によりダイヘキサマーが減少したことで ThT 応答が消失したと推察された。

(A)



(B)

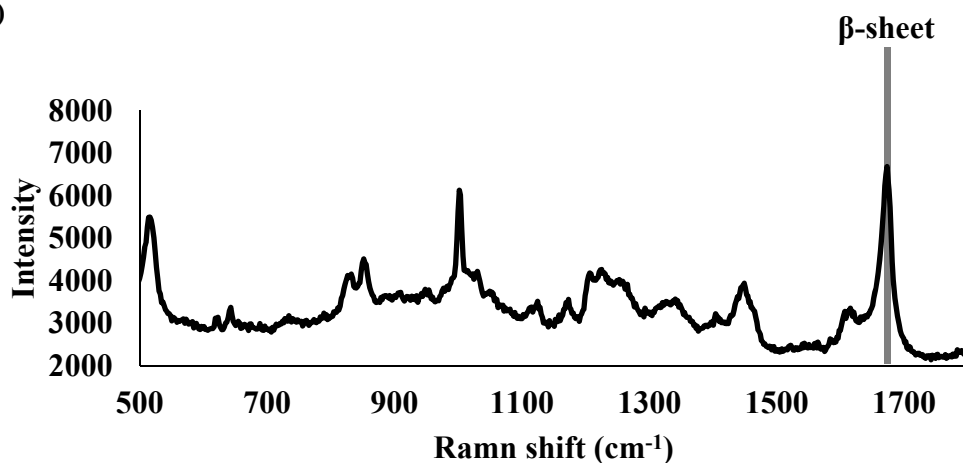


Fig. 26 Fibril formation experiment of insulin degludec (A) and Raman spectrum of precipitated solid in fibril formation experiment (B).

Each value of (A) is expressed as mean \pm S.D. (n = 3-4).

添加剤を除去した条件でのインスリンデグludecの会合状態を研究すべく、CD 測定により、製剤中のトレシーバ®と製剤から添加剤を除去したインスリンデグludecの立体構造を比較した。その結果、添加剤を除去したインスリンデグludecでは、モノマーの比率が増加していた (Fig. 27, Table 8)。したがって、添加剤を除去したインスリンデグludecでは、モノマー比率の増加により、線維化が促進されたと考えられる。すなわち、トレシーバ®は、保存状態ではダイヘキサマーとして存在することで線維化しにくい安定な製剤であるが、皮下に注射されたとき、低分子である添加剤が早期に拡散し、徐々にモノマーを生じるため、*in vivo* において、トレシーバ®が他の製剤と比較して線維化しにくいと言いきることはできないことが示された。

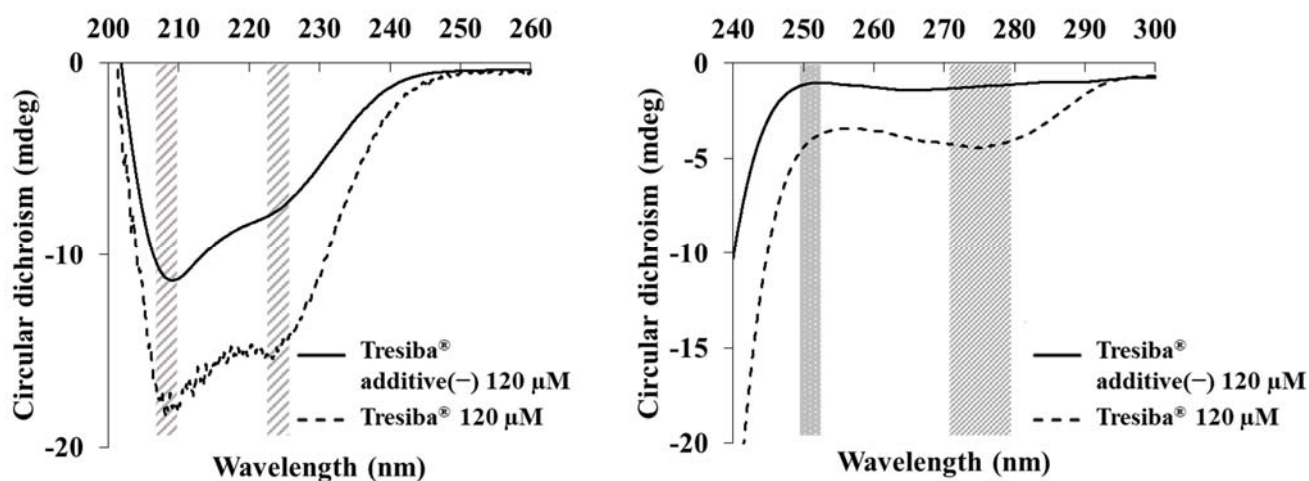


Fig. 27 CD spectra of insulin degludec.

Table 8 CD spectrum value of insulin degludec.

	208 nm /222 nm	251 nm	276 nm
Tresiba® 120 µM	1.177385	-3.87665	-4.37652
Tresiba® additive (–) 120 µM (insulin deguldec)	1.431902	-1.03601	-1.2008

第3節 持効型インスリン製剤の線維化における異種核共存の影響

第1章の結果から、ヒトインスリンの線維化は、ヒトインスリンの線維核の共存によって、物理的刺激が弱い条件でも促進されることが明らかとなった (Fig. 28 (A)) が、この結果は同種分子間での反応であった。そこで、本節では、ヒトインスリンと持効型インスリンアナログという異種分子間においても核の生成による線維化の促進が起こるかを *in vitro* と *in vivo* との両方の系で評価した。異種分子間においても、同様に、核成長反応が起こる場合 (Fig. 28 (B))、製剤を切り替えることが、線維化の進行や、IDA およびインスリンボールの形成抑制に有効とは言えないことを意味する。しかし、異種分子間において核成長反応が起こらない場合 (Fig. 28 (C))、製剤を切り替えることは、線維化の進行や、IDA およびインスリンボールの形成抑制に有効な手段となる。

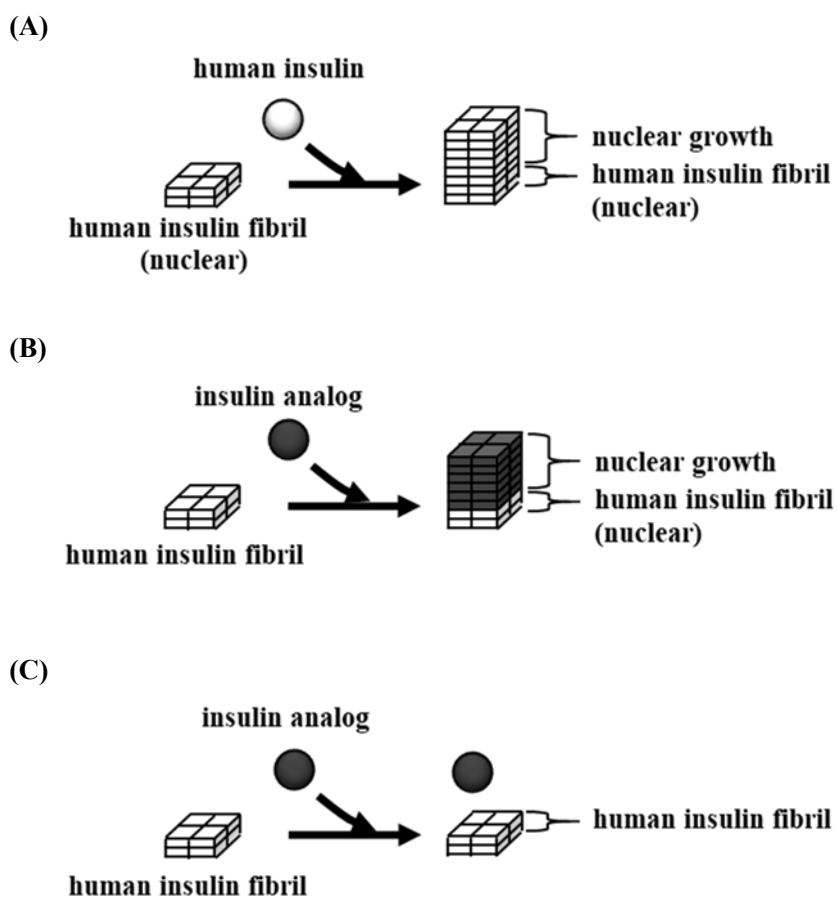


Fig. 28 Reactivity of homologous and heterologous molecules to insulin nucleus.

3-1. 異種核存在下での持効型インスリンの線維化促進

第1章 2-2と同様に、まず、線維化が進行しやすい850 rpmで、ヒューマリン®Rを用いてヒトインスリンのアミロイド線維を形成させた(Fig. 29(A))。それを各種持効型製剤に添加し、線維化が進行しにくい30 rpmで旋回振盪させた(Fig. 29(B))。その結果、各種製剤の単独の振盪では、全ての製剤でThT 蛍光の上昇がみられなかったのに対し、ヒトインスリン線維核共存下での各種製剤の振盪では、ランタス®とレベミル®ではThT 蛍光が速やかに上昇した(Fig. 30)。このことから、ヒトインスリンの線維核に対して、ランタス®中のインスリングルラルギンやレベミル®中のインスリンデテミルがFig. 28(B)に示したように、核成長反応を起こしたと考えられる。一方、トレシーバ®では、ThT 蛍光の速やかな上昇は見られなかった。しかし、保存状態において、もともとThT 蛍光を有するトレシーバ®では、ThT 蛍光の観察だけで、ヒトインスリンの線維核に対して、インスリンデグルデクがFig. 28(C)に示したように、核成長反応を起こさなかったと言い切ることはできない。トレシーバ®において、インスリン線維核に対する核成長反応が起こらなかったことを証明するには、線維核の成分を分析し、その固体中にヒトインスリンのみが存在することを検証するなどの実験が必要であると考えられる。

以上の結果から、異種分子間においても、線維化が進行しにくい30 rpmで、容易に核の成長、つまり線維化が進行することが明らかとなった。すなわち、*in vitro*の検討では臨床の治療の場において、製剤の変更によるアIDAやインスリンボールの進行抑制は期待できないことが示唆された。

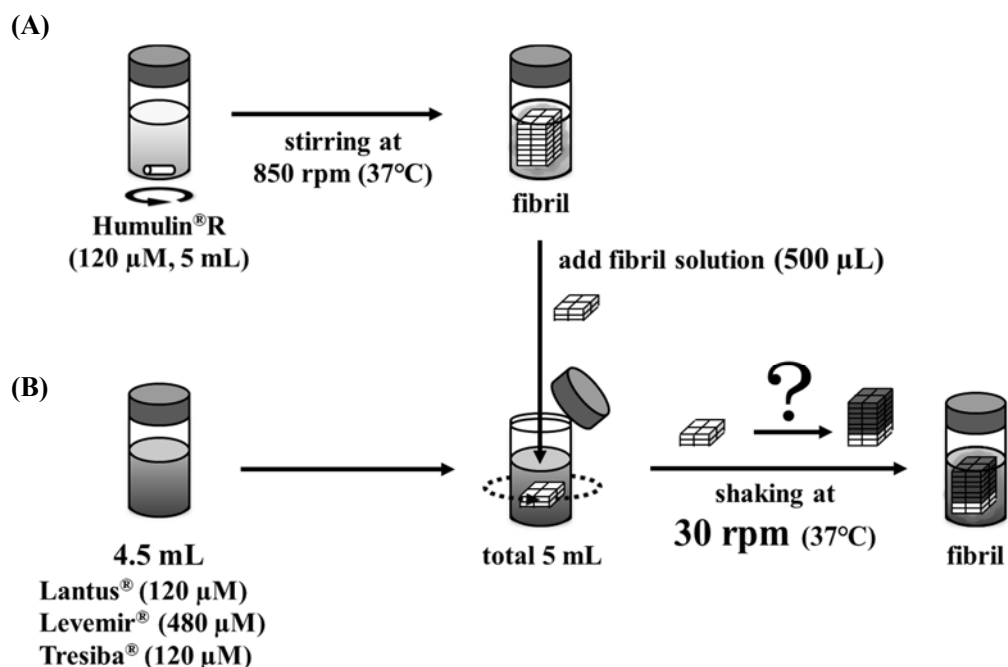


Fig. 29 Procedure of nuclear growth experiments in the presence of dissimilar molecule nuclear.

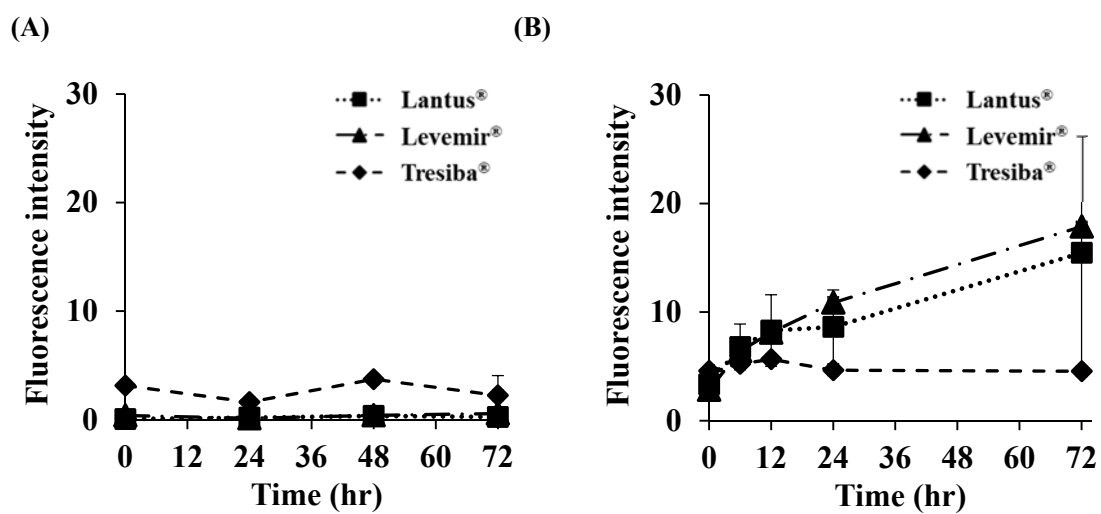


Fig. 30 Fibril formation of the long-acting formulations in the presence of human insulin nucleus.

Not presence of human insulin nucleus (A) and presence of human insulin nucleus (B). Each value is expressed as mean \pm S.D. (n = 3).

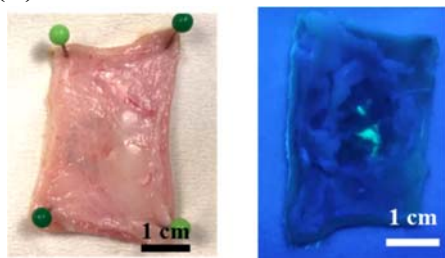
3-2. 異種核共存下での持効型インスリンの繰り返し投与による *in vivo* での線維化

3-1の結果から、*in vitro*において、異種分子間でも核の成長が起こることが明らかとなり、本節では、*in vivo*においても同様の現象が見られるかを検証した。

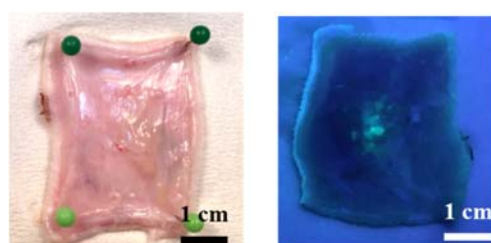
まず、*in vitro*で、ヒューマリン®Rを250 rpm、50℃で巡回振盪してヒトインスリンのアミロイド線維を調製し、生じた懸濁液を限外ろ過(MWCO:100 kDa)し、上部に残存した固体を凍結乾燥して、線維化ヒトインスリンの粉末を得た。その線維化ヒトインスリンの粉末を5 mg/mLでPBSに懸濁させ、ラットの左右背部に500 µg/100 µL/bodyで皮下投与した。その後、ラットをコントロール群と製剤群に分け、コントロール群では核投与部位にPBSを1日1回50 µLを3週間、製剤群では各種持効型製剤を1日1回50 µL(5 IU)を3週間、皮下投与した。また、低血糖防止のために、製剤を投与する際は、併せてスクロース(50%aqを0.5 mL/kg(250 mg/kg))を腹腔内に投与した。

3週間後、背部皮膚を切り、投与部位を摘出した。摘出後、投与部位を撮影し(Fig. 31(left))、ThT(100 µM)に一晩浸漬した後、暗所で365 nmの蛍光を照射した状態で再度撮影した(Fig. 31(right))。ランタス®(Fig. 31(A))とレベミル®(Fig. 32(B))において、ThTの強い蛍光が観察され、*in vivo*でも異種分子間の核の成長が生じていると推察された。トレシーバ®(Fig. 31(C))ではほとんど蛍光が観察されず、この結果は*in vitro*の結果と一致した。しかし、核+PBS連続投与群(Fig. 31(D))においても、わずかに蛍光が確認されたため、投与部位において、初回に投与したヒトインスリン線維核が残存していることも考えられた。*In vivo*において異種分子間で核が成長しているかを確認するためには、全ての製剤群で、皮下で蛍光を発した固体の成分を分析し、その固体中にヒトインスリンとは異なる分子、つまりそれぞれのインスリンアナログが存在することを検証するなどの実験が必要であると考えられる。

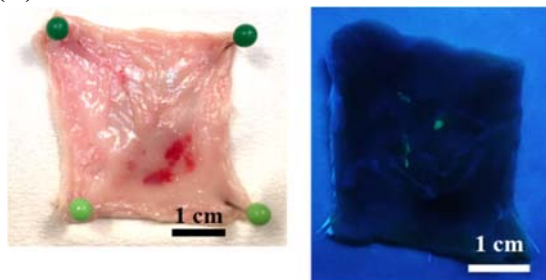
(A) nuclear + Lantus®



(B) nuclear + Levemir®



(C) nuclear + Tresiba®



(D) nuclear + PBS

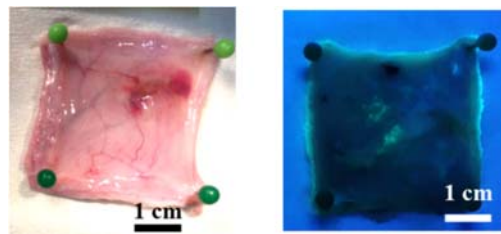
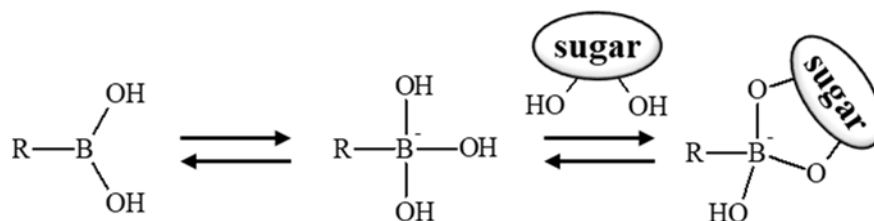


Fig. 31 Nuclear growth experiments between different molecules *in vivo*.

第 4 節 新規インスリン誘導体の合成とその活性および線維化の検討

現存するほとんどの持効型インスリン製剤でインスリンボールの形成が確認されているのが現状である。そこでアミロイドーシス、つまり生体内での線維化を回避できる新規インスリン製剤を設計することが必要と考えられた。また、新規インスリン誘導体を用いての線維化特性の検討は、化学構造と β 化との関係をよりよく理解するためにも有効と考えられる。そのためには、本研究の主とするテーマであるインスリンの線維化機構の正確な理解が不可欠であり、また同時に適切なインスリン作用持続の機構を設計に組み込むことが望まれる。そこで本節では、糖類が有するポリオールと可逆的に環状エステル結合を形成するボロン酸誘導体に着目した (Scheme 1) [73, 74]。ボロン酸誘導体は、細胞表面糖鎖に存在するシアル酸、グルコース、マンノース、ガラクトースにも結合する (Table 9)。また、ボロン酸誘導体で修飾されたタンパク質は、細胞表面糖鎖のシアル酸に結合後、細胞内にエンドサイトーシスで取り込まれることが報告されている [75, 76]。したがって、ボロン酸を修飾したインスリンは、糖鎖との相互作用により持続性を有し、かつ細胞内で消化されることで、皮下に残存しない特徴を有することが期待できる。



Scheme 1. Equilibrium of boronic acid derivatives and a sugar.

Table 9 Binding constants (K_{eq}) with 3-(propionamido)phenylboronic acid at pH 7.4

binding constant K_{eq} (M^{-1})	
sialic acid	37.6 ± 3.1
glucose	5.1 ± 3.1
mannose	8.5 ± 1.2
galactose	15.0 ± 2.2

ヒトインスリンへの化学修飾は、一般的にヒトインスリンの N 末端および B 鎖 29 位のリジン残基への 1 級アミノ基への修飾が行われている [77-79]。ボロン酸誘導体として、4-カルボキシフェニルボロン酸 (4CPBA) を選択し、カルボキシル基とヒトインスリンのアミノ基を縮合させ、アミド結合により 4CPBA をヒトインスリンに修飾し PBA-Ins を合成した [80]。

PBA-Ins に期待する機能は 3 つある。第一に、皮下細胞糖鎖への結合により立体構造変化 (α 構造 \rightarrow β 構造) が抑制され、アミロイドーシスが回避される機能 (Fig. 32 (①))、第二に、皮下細胞糖鎖への結合後、細胞内へ取り込まれて消化されることで、皮下にインスリンが残存せず、アミロイ

ドosisが回避される機能 (Fig. 32 (②))、第三に、これは必須の機能であるがインスリンとしての活性が保たれていることである (Fig. 32 (③))。そして、これらの機能を有すると同時に、製剤として日常的に利用できるように、保存中において線維化が生じない必要がある。すなわち本研究でこれまで示したような要因により β 化を生じにくいような保存時の会合状態、平衡により生じたモノマーの β 化への耐性について条件を満たすことが必要となる。

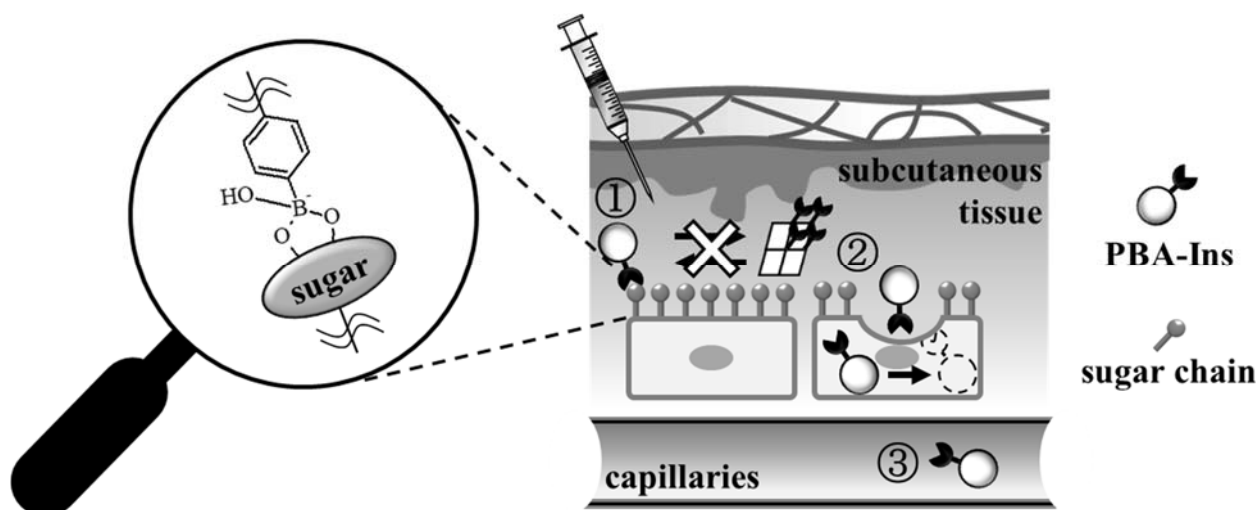


Fig. 32 Expected PBA-Ins pharmacokinetics.

4-1. PBA-Ins の合成

4CPBA のカルボキシ基をクロロギ酸イソブチルを用いて活性化後、ヒトインスリンの 1 級アミノ基 (A 鎖 N 末端、B 鎖 N 末端、B 鎖 29 位のリジン残基) に反応させ、PBA-Ins を得た。PBA-Ins の合成確認は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析装置 (MALDI TOF-MS) を用いて、PBA-Ins の分子量と同じ分子イオンピークを確認することで行った。

4-2. PBA-Ins の 4CPBA 修飾数の評価

得られた PBA-Ins の 4CPBA 修飾数を評価するために、4CPBA が 1 級アミノ基に修飾されていることを利用して、1 級アミノ基に結合する 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) が結合する数から PBA-Ins 中の 4CPBA 修飾数を算出した。TNBS をヒトインスリンおよび PBA-Ins のそれぞれに反応させた後、その吸収スペクトルを測定し、得られた 351 nm の吸光度 (Abs) (Table 10) を *equation* 式 (1) に適用した。

$$n = \left(1 - \frac{\text{Abs}_{\text{PBA-Ins}} - \text{Abs}_{\text{TNBS}}}{\text{Abs}_{\text{Ins}} - \text{Abs}_{\text{TNBS}}} \right) \times 3 \quad \cdots \text{equation (1)}$$

Table 10 Absorbance value of TNBS.

Abs at $\lambda=351$ nm	
human insulin	0.61297
PBA-Ins	0.58047
TNBS	0.56791

その結果、PBA-Ins は、ヒトインスリンに 4CPBA が平均で 2.16 個修飾されていることが明らかとなった。

4-3. PBA-Ins の血糖降下作用の評価

4-3-1. 静脈内投与後の血糖降下作用の評価

PBA-Ins に期待する機能③ (Fig. 32) である、PBA-Ins のインスリンとしての機能、すなわち血糖降下作用が、4CPBA 修飾後において保持されているかを評価した。

血糖降下作用の評価は、ストレプトゾシン の投与により作製した糖尿病モデルラットを用いて行った。ラットを絶食後、ヒトインスリンと PBA-Ins を $190 \mu\text{g/kg}$ を静脈内に投与し、血漿中グルコース濃度を測定した。その結果、PBA-Ins はインスリンとしての活性が保持されており、かつ、静脈内において持続作用を有していた (Fig. 33)。

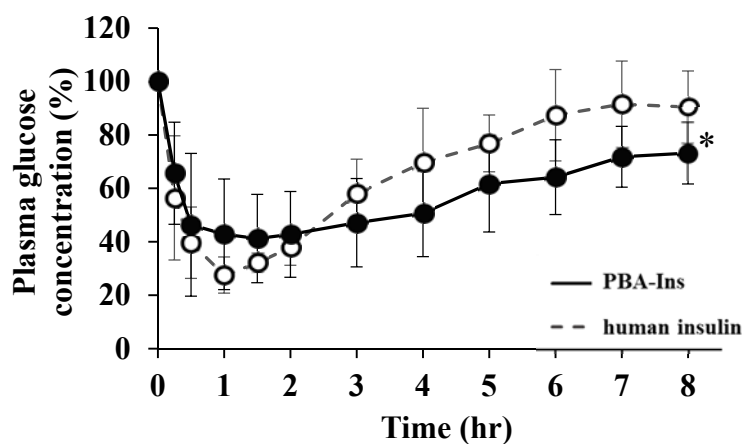


Fig. 33 Blood glucose level profile after intravenous injection of $190 \mu\text{g/kg}$ human insulin (○) or PBA-Ins (●).

Each value is expressed as mean \pm S.D. ($n = 6$); * $P < 0.05$ at 8 hr after intravenous administration, calculated using Student's t-test.

4-3-2. PBA-Ins と赤血球との相互作用の評価

PBA-Ins の静脈内投与における持続作用機構を考えた場合、血中に存在する赤血球の糖鎖との可逆結合が考えられる。赤血球は糖鎖を複数有しており、レクチンなどの糖結合タンパク質が結合し、赤血球の凝集を起こすことが知られている[81]。また、ボロン酸基 2 つをアジピン酸に修飾したボロン酸誘導体もレクチンと同様に赤血球凝集を引き起こす[82]。そこで、PBA-Ins と赤血球の相互作用を確認するために、赤血球と結合するレクチンで行われている、赤血球凝集試験を行った。

レクチンによる赤血球凝集試験では、凝集がある場合には沈降した赤血球が U 字底のウェル底部に大きく広がり、凝集がない場合には沈降した赤血球は小さな点となる。赤血球凝集試験を行うにあたり、本節では綿羊赤血球を用いた。これをヒトインスリンと PBA-Ins のそれぞれと混合し、赤血球凝集反応の有無を評価した。最終濃度として、赤血球 800 倍希釈溶液にヒトインスリンと PBA-Ins を 170 μM で混合した結果、赤血球のみを入れたウェル (Fig. 34 (Well A-1,2,3)) と赤血球にヒトインスリンを添加したウェル (Fig. 34 (Well B-1,2,3)) では、沈降した赤血球は小さな点となり、赤血球凝集反応は生じなかった。一方、赤血球に PBA-Ins を添加したウェルでは、U 字底のウェル底部に沈降した赤血球が大きく広がり、赤血球凝集反応が確認された (Fig. 34 (Well C-1,2,3))。また、ウェル A-1、B-1、C-1 を光学顕微鏡で観察した結果、A-1、B-1 では、赤血球が分散していたのに対し、C-1 では、赤血球の凝集が見られ (Fig. 35)、Fig. 34 と同様の結果となった。この結果から、PBA の存在により、PBA-Ins が赤血球凝集反応を起こしたと考えられる。

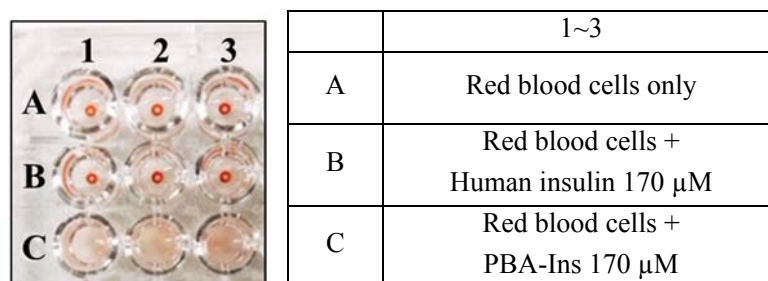


Fig. 34 In-well condition of red blood cell aggregation test.

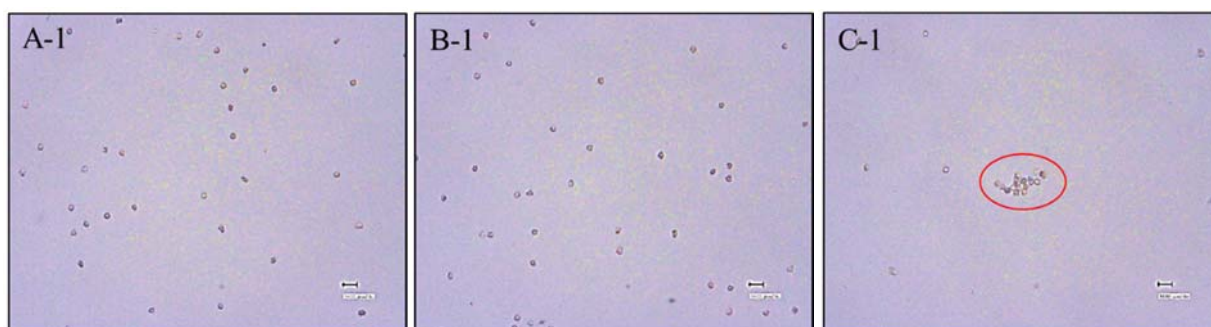


Fig. 35 In-well condition of red blood cell aggregation test observed by microscope.

4-3-3. 静脈内投与後の腹腔内グルコース負荷による持続作用の評価

PBA-Ins の静脈内での持続作用が赤血球との結合によるものと示され、さらに、赤血球はエンドサイトーシス機能を有していないことから、PBA-Ins は赤血球表面糖鎖に結合し、そこに留まっていると考えられた。そこで、PBA-Ins を静脈内投与して 2.75 時間経過した後に、腹腔内にグルコースを 1 g/kg で投与し、血液内で赤血球に結合して循環していると予想される PBA-Ins が血糖降下作用を発現するかを調査した。グルコース投与に伴う血糖値上昇後、ヒトインスリン投与群では血糖値が上昇したままであったが、PBA-Ins 投与群では血糖値が再降下した (Fig. 36 (A))。6 時間の血糖値を 2.75 時間の血糖値で除して、血糖上昇率を算出した結果、ヒトインスリン投与群では 2.2 であったのに対し、PBA-Ins 投与群では 1.4 で、ヒトインスリン投与群に比べ PBA-Ins 投与群では有意に血糖値が降下していた (Fig. 36 (B))。このことから、血液内で赤血球表面糖鎖に結合して循環している PBA-Ins が遊離して、血糖降下作用を示したと推察された。

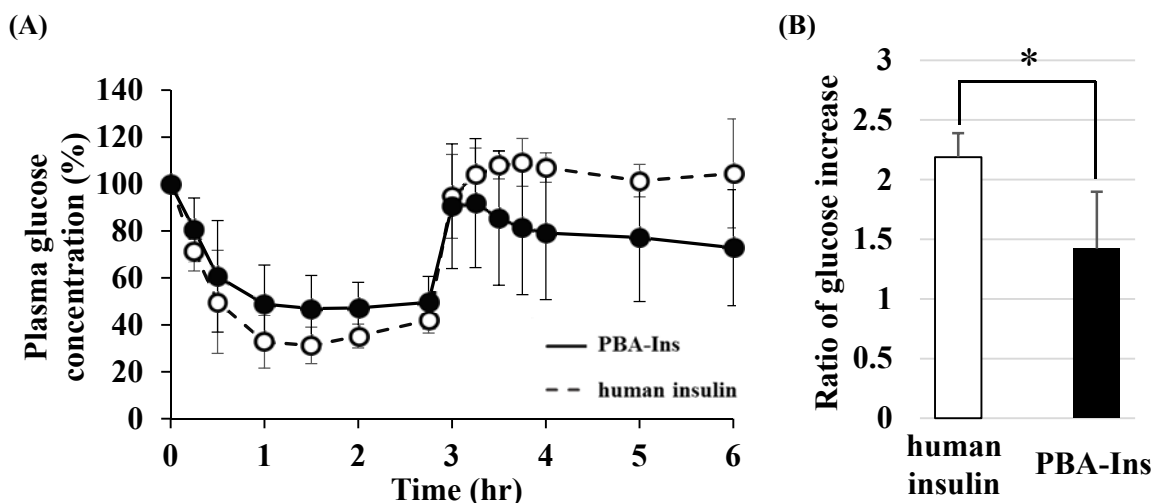


Fig. 36 The effect of abdominal injection of glucose (1 g/kg) at 3 h after intravenous injection of human insulin or PBA-Ins (190 µg/kg).

(A) Profile of blood glucose level of human insulin (○) or PBA-Ins (●). Each value is expressed as mean ± S.D. (n = 4 or 6). (B) The ratio of glucose increase, which was calculated by dividing glucose level (6 hr) by glucose level (2.75 hr). * $P < 0.05$ calculated using Student's t-test.

4-3-4. 皮下投与後の血糖降下作用の評価

インスリンは通常、皮下投与で用いられること、さらに、PBA-Ins は皮下細胞糖鎖への結合により立体構造変化 (α 構造 $\rightarrow\beta$ 構造) が抑制され、アミロイドーシスが回避されること (Fig. 32 (①))、また、皮下細胞糖鎖への結合後、細胞内へ取り込まれて消化されることで、皮下にインスリンが残存せず、アミロイドーシスが回避されること (Fig. 32 (②)) を期待していることから、PBA-Ins の皮下投与における血糖降下作用を評価した。4-3-1 の結果から、PBA-Ins が静脈内において持続作用を有することが明らかとなったが、皮下投与においても、皮下細胞糖鎖と相互作用することで持続的な作用を示す可能性がある。

血糖降下作用の評価は、ストレプトゾシンの投与により作製した糖尿病モデルラットを用いて行った。ラットを絶食後、ヒトインスリンもしくは PBA-Ins を 190 $\mu\text{g/kg}$ を皮下に投与し、血漿中グルコース濃度を測定した。その結果、PBA-Ins の静脈内投与では、ヒトインスリンと同等な血糖降下作用を示していたのに対し (Fig. 33)、皮下投与では、ヒトインスリンに比べて、血糖降下作用が著しく減弱していた (Fig. 37)。この結果は、PBA-Ins の皮下細胞糖鎖への結合が関係していると考えられる。PBA と糖類の結合は可逆的であること、また、皮下投与においてもある程度の血糖降下作用が見られたことから、皮下細胞糖鎖への結合後に細胞内へ取り込まれている PBA-Ins もあれば、血管内に移行している PBA-Ins も存在すると推察される。

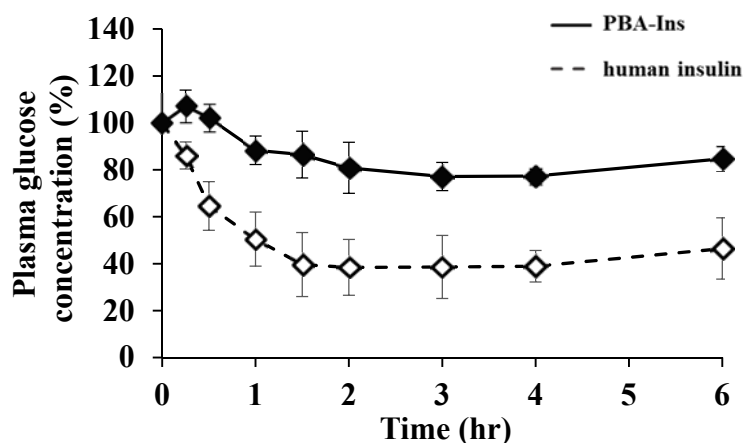


Fig 37. Blood glucose level profile after intravenous injection of 190 $\mu\text{g/kg}$ human insulin or PBA-Ins. Each value presents mean \pm S.D. (n = 6); * $P < 0.05$ at 8 hr after intravenous administration, calculated using Student's t-test.

4-3-4. 皮下投与後の腹腔内グルコース負荷による血糖降下作用の評価

皮下投与された PBA-Ins の皮下組織での挙動を調べるために、PBA-Ins を皮下投与して 2.75 時間経過した後に、腹腔内にグルコースを 1 g/kg で投与し、PBA-Ins の皮下投与における血糖降下作用の減弱が、皮下細胞糖鎖と結合後、速やかに細胞内に取り込まれることに起因しているのかを調査した。グルコース投与に伴う血糖値上昇後、ヒトインスリン投与群では、5～6 時間の間に血糖値の増加が観察されたのに対し、PBA-Ins 投与群では、3～6 時間で血糖値が減少する傾向にあった。6 時間の血糖値を 2.75 時間の血糖値で除して、血糖上昇率を算出した結果、ヒトインスリン投与群では 2.5 であったのに対し、PBA-Ins 投与群では 1.2 で、ヒトインスリン投与群に比べ PBA-Ins 投与群では有意に血糖値の上昇が抑制されていた (Fig. 38 (B))。この結果から、PBA-Ins は、皮下投与後一定時間は皮下組織に存在していると推察される。

PBA-Ins の皮下細胞糖鎖への結合による立体構造変化 (α 構造 $\rightarrow\beta$ 構造) の抑制 (Fig. 32 (①)) や、皮下細胞内取り込み (Fig. 32 (②)) に関しては、将来の課題として、*in vitro* での細胞実験などを行い、皮下投与された PBA-Ins の皮下組織での挙動を詳細に評価する必要があるが、PBA-Ins が皮下投与においても持効型インスリンとして機能することが明らかとなった。

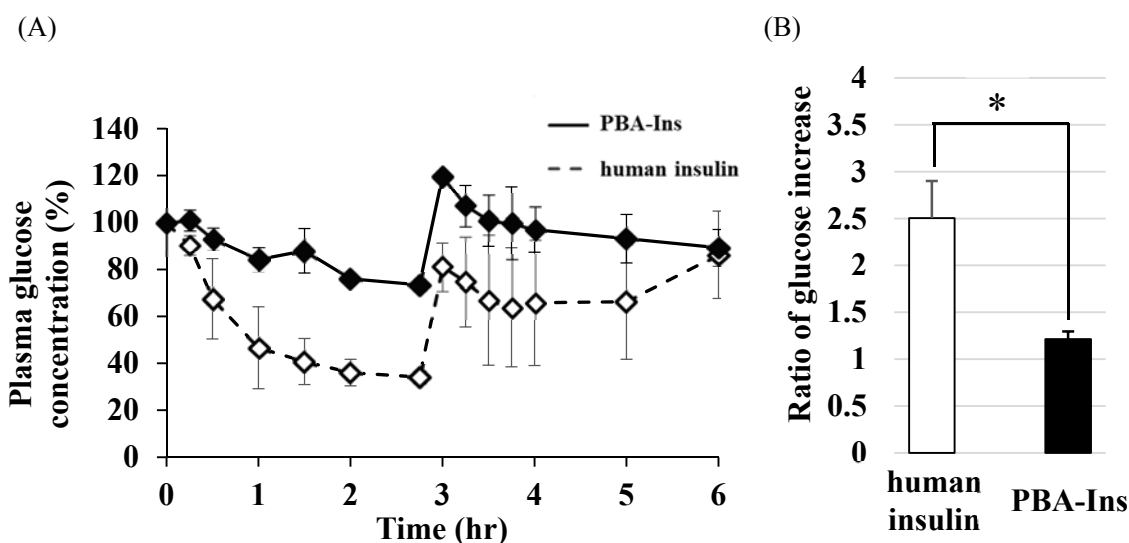


Fig. 38 The effect of abdominal injection of glucose (1 g/kg) at 2.75 hr after intravenous injection of human insulin or PBA-Ins (190 μ g/kg).

(a) Profile of blood glucose level. Each value presents mean \pm S.D. (n = 4 or 6). (b) The ratio of glucose increase, which was calculated by dividing glucose level (6 hr) by glucose level (2.75 hr). * $P < 0.05$ calculated using Student's t-test.

4-4. PBA-Ins の線維化試験

4-3 において、PBA-Ins が静脈内においても皮下においても持続的な血糖降下作用を有していることが明らかとなり、本節では、PBA-Ins が保存中において線維化が生じるかどうか、すなわち *in vitro* で線維化するかを評価した。

PBA-Ins 溶液 (120 μ M) をバイアル中で 850 rpm で攪拌し、線維化を評価した。ヒトインスリンでは、速やかに ThT の蛍光が上昇したのに対し、PBA-Ins では 24 時間では、ThT の蛍光上昇は見られなかった (Fig. 39)。PBA-Ins は *in vitro* において、通常のヒトインスリンに比べ線維化が抑制されることが明らかとなった。

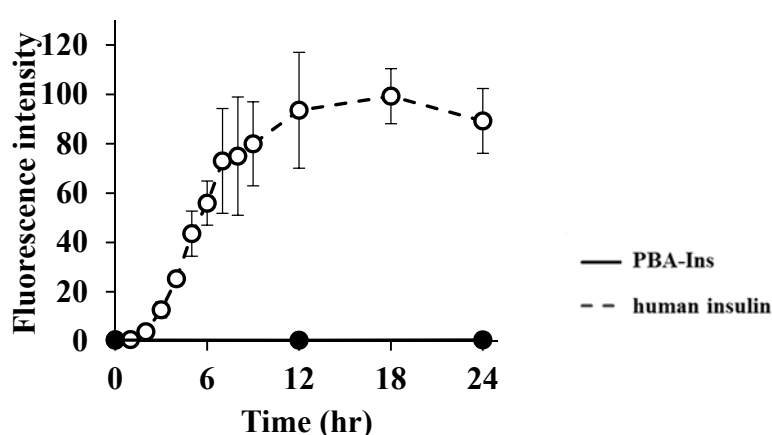


Fig. 39 Fibril formation experiment for PBA-Ins.

ThT fluorescence intensity of human insulin (○) and PBA-Ins (●) when shaking at 850 rpm were evaluated. Each value is expressed as the mean \pm S.D. (n=3).

In vivo において、アミロイドーシスを生じないインスリン誘導体としてボロン酸を有する PBA-Ins を設計し、*in vitro* において、線維化が抑制されるという、製剤において必要な条件を満たしていることが確認できた。*In vitro* において、PBA-Ins の線維化が抑制される理由を調べることは、インスリンの線維化と化学構造の関係のより深い理解にもつながると考えた。すなわち、化学修飾によるヒトインスリンの化学構造の変化と線維化への耐性の関係を明らかにするため、検討の初めとして、1. 修飾部位の確認、2. 長期保存による β 構造形成の確認、3. 会合状態の確認を行った。

4-5. PBA-Ins の 4CPBA 修飾部位の特定

PBA-Ins の 4CPBA 修飾数に関しては、4-2 から、平均 2 個であることが示されている。ここでは、4CPBA の修飾部位を特定するため、PBA-Ins のトリプシンによる消化 (Fig. 40 (A)) とジチオトレイトールとヨードアセトアミドによる還元アルキル化 (Fig. 40 (B)) を行った。結果、PBA-Ins の 4CPBA は、A 鎖の N 末端 (A1) と B 鎖の N 末端 (B1) に修飾されているものが多いことが示された (Table 11)。

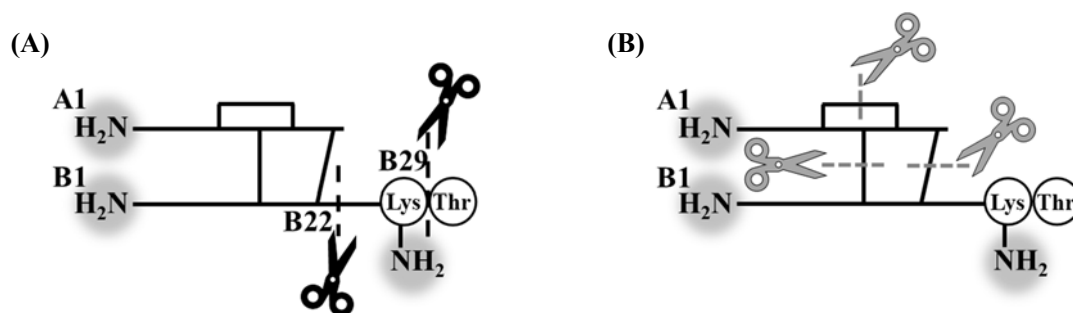


Fig 40. Digestion site by trypsin and reduction site by dithiothreitol and iodoacetamide in human insulin.

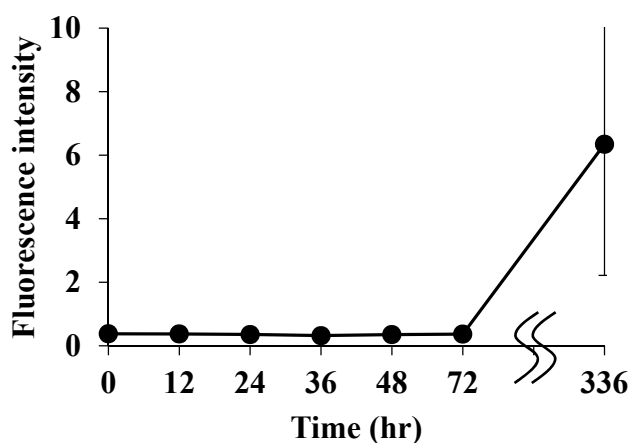
Table 11 Molecular ion peak of PBA-Ins in MALDI TOF-MS.

		<i>m/z</i>		
		human insulin	PBA-Ins	PBA-Ins calculate
trypsin	A chain + B (1-22)	4895.8487	4894.2740	—
	A chain + B (1-22) + PBA	—	5007.7384	5006.2740
	A chain + B (1-22) + PBA + PBA	—	5125.2419	5117.2740
	B (23-29)	870.0885	870.0784	—
	B (23-29) + PBA	—	no peak	982.0.784
dithiothreitol and iodoacetamide	A chain	2589.1153	2589.1144	—
	A chain + PBA	—	2689.1410	2701.1144
	B chain	3499.8179	3499.8318	—
	B chain + PBA	—	3611.9123	3611.8318
	B chain + PBA + PBA	—	3765.9046	3722.8318

4-6. PBA-Ins の長期保存による線維化試験

PBA-Ins 溶液 (120 μM) をバイアル中で 850 rpm で 4-4 よりも長時間攪拌し、長期保存による線維化を評価した。PBA-Ins は、攪拌後 336 時間で ThT 蛍光が上昇した (Fig. 41 (A))。その時の析出物をラマン分光測定した結果、 β 構造を有していた (Fig. 41 (B))。PBA-Ins は、長時間攪拌することで線維化が起こったことから、化学修飾により β 構造を生じない特性を得るわけではないことが明らかとなった。

(A)



(B)

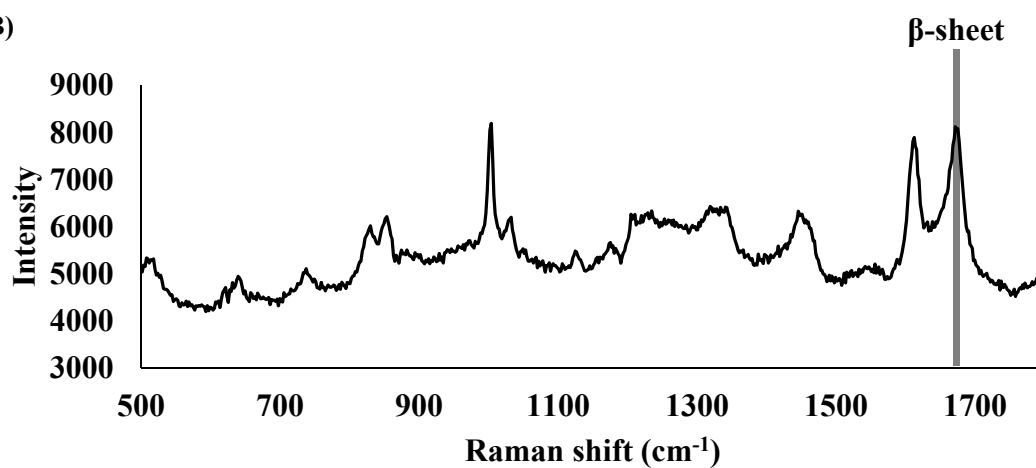


Fig 41. Long term fibril formation experiment for PBA-Ins (A) and Raman spectrum of precipitated solid in fibril formation experiment (B).

4-7. PBA-Ins の立体構造と亜鉛含有量の評価

PBA-Ins の会合状態を CD 測定により評価するうえで、原子吸光光度計を用いて、PBA-Ins 中の亜鉛イオンの含有量を評価した。PBA-Ins は、ヒトインスリンに比べて亜鉛イオンの含有量が低かった (Table 12) が、ヒトインスリンとほぼ同様の会合状態を有していた (Fig. 42, Table 13)。それに関わらず、PBA-Ins は *in vitro* において、線維が形成されにくく、A 鎖 B 鎖の N 末端への修飾は β 構造形成に抑制的に働き、 β 構造への変化速度を低くしていると考えられた。

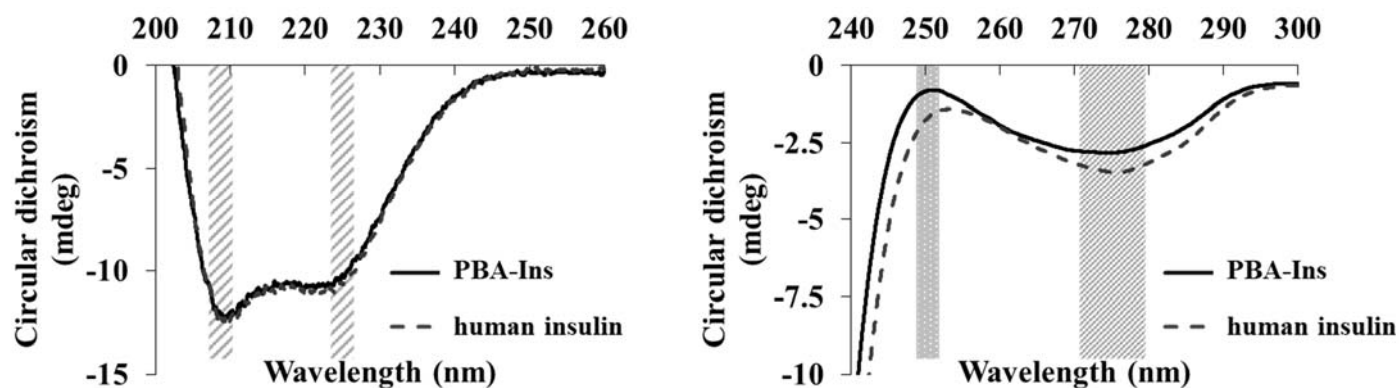


Fig. 42 CD spectra of PBA-Ins.

Table 12 Zinc ion concentration of PBA-Ins.

ratio of zinc ion concentration	
human insulin	100.0%
PBA-Ins	77.7%

Table 13 CD spectra value of PBA-Ins.

	208 / 222 nm	251 nm	276 nm
human insulin	1.114926	-1.49956	-3.31668
PBA-Ins	1.138648	-0.80997	-2.80041

第5節 小括

第1章の結果から、ヒトインスリンはモノマーとして存在すると線維化が起こりやすいが、ヘキサマーとして安定化されていると線維化が抑制されることが明らかとなった。インスリンアナログ製剤には、超速効型や持効型があり、それぞれの化学構造や添加剤の種類が異なっている。それらの製剤間の線維化のしやすさを考えた場合、化学構造や添加剤の違いによるヘキサマーの安定性の違いや、そこから生じたモノマー自身の β 構造への変換に対する耐性の違いが要因となると考えられる。本章では、持効型製剤に着目して、各種製剤間の線維化のしやすさを比較し、また、その違いについて考察した。

持効型製剤の線維化のしやすさを比較する前に、持効型製剤のひとつであるレベミル[®]を、ラットの背部の同一部位に3週間皮下投与したところ、投与部位にアミロイドーシスが生じた。臨床でのインスリンボールの報告は、インスリンの使用歴が10年以上であることが多いが、10数年という長期間でなくとも、IDAやインスリンボールが形成される可能性があることが明らかとなった。この結果からも、持効型インスリン製剤の線維化を比較することは重要であることが示されたため、詳細に比較検討した。

持効型製剤原液を850 rpmで攪拌すると、試験した3種の全てにおいて線維化が進行した。しかしその線維化速度は、製剤によって異なっており、CD測定により会合状態を比較した結果、製剤中にモノマーが多いと速く、ヘキサマーやダイヘキサマーの形成率が高いと遅い傾向にあった。その中でも、他と比べて著しく線維化の速度が遅かったトレシーバ[®]について、製剤中添加物を除き、インスリンデグルデクの線維化を評価した。この検討により、トレシーバ[®]の線維化に対する耐性が、製剤中のインスリンデグルデクの安定なダイヘキサマーの形成によるものなのか、インスリンデグルデク自体がモノマーでも β 線維化しにくい性質を有することによるものなのか、判断できると考えた。結果として、添加剤を除去したインスリンデグルデクを850 rpmで攪拌すると、線維化が原液に比べて著しく促進された。CD測定により、添加剤が存在しないインスリンデグルデクでは、モノマーの比率が増加していた。このことから、トレシーバ[®]の線維化に対する耐性は、安定なダイヘキサマーとして存在することによると考えられた。しかし、*in vivo*で投与されたトレシーバ[®]では、はじめ、マルチヘキサマーが形成されるが、低分子である添加剤が、高分子のインスリンデグルデクよりも速く拡散消失することで、徐々にモノマーを生じて吸収される。したがって、臨床において、トレシーバ[®]が線維化しにくい有用な製剤であるとは断言しがたい結果が示された。

第1章の結果から、ヒトインスリンの線維化は、ヒトインスリンの線維核の存在によって、物理的刺激が弱い条件でも促進されることが明らかとなった。このことは、異種分子間においても、同様の核成長反応が起こった場合、製剤の切り替えは、線維化の進行や、IDAおよびインスリンボールの形成抑制に有効とはならないことを示唆している。検討の結果、異種分子間においても線維化は促進され、製剤の変更による線維化の進行や、IDAおよびインスリンボールの形成抑制は期待でき

ないことが分かった。これらの結果から、治療に関わる医師や薬剤師が十分に理解しておくべき事柄を明らかにできた。

本章では、現在上市されているインスリンアナログ製剤のほとんどにおいてインスリンボール形成の報告があるため、*in vivo* でアミロイドーシスを生じない新規インスリン誘導体についても検討を行った。新規誘導体を用いての線維化の検討は、インスリンの化学構造と β 化との関係をよりよく理解するためにも有効と考えられた。そこで *in vivo* でアミロイドーシスを生じないと考えられるインスリン誘導体として、糖鎖結合能を有する PBA-Ins を合成した。PBA 修飾数は平均 2 個で、A 鎖の N 末端 (A1) と B 鎖の N 末端 (B1) に修飾されているものが多いことが分かった。また、PBA-Ins は静脈内投与においてヒトインスリンと同等の血糖降下作用を示し、かつ、赤血球に結合することで作用持続性を有していた。PBA-Ins は皮下投与において、血糖降下作用の減弱が確認された。PBA-Ins の皮下における動態に関しては、今後、*in vitro* での細胞実験などの詳細な検討が必要であるが、PBA-Ins の皮下細胞糖鎖との結合は可逆的で、細胞内に移行するものもいれば、血管内に移行するものもいることが推察された。

さらに興味深いことに、PBA-Ins は *in vitro* において線維化が進行しにくかった。CD を用いた分析の結果、PBA-Ins のモノマー含有率はヒトインスリンと同等だった。このことから、A 鎖 B 鎖の N 末端への修飾は β 構造形成に抑制的に働くと考えられた。

インスリンアナログ製剤と PBA-Ins を用いて、分子構造と線維化のしやすさを検討した結果、A1B1 位への修飾が線維化抑制に効果的であると示された。これが PBA 特有の効果なのか、修飾位置の問題なのかは明らかにできなかったが、A1 への中分子から高分子の修飾は、インスリンの活性に影響を及ぼすため (Fig. 43) [33]、線維化と活性の観点から、慎重に検討を進める必要がある。

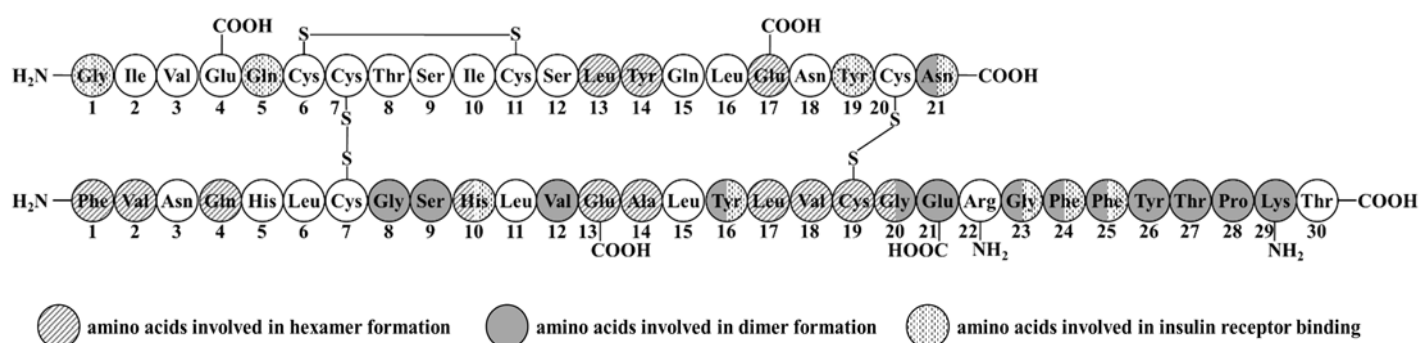


Fig. 43 Amino acid sequence and function of human insulin.

第3章 皮下に存在する線維化ヒトインスリンのヒトインスリン吸収性への影響

第1節 小緒言

目視で確認可能なインスリンボールによるインスリンの吸収障害機構は、まだ十分に解明されていないが、組織の硬結に関連していると推察されている。例えば、菊池らは、インスリンボール部位の超音波検査の結果から、硬い組織において、注射液が十分拡散せず、それがインスリンの吸収低下と関係すると推察している[83]。一方、中村らは、4つの仮説を立てている[84]。第一に、皮下に存在する線維化インスリンの沈着物が、投与したインスリンの物理的障壁となり、投与したインスリンの拡散が抑制される機構 (Fig. 44(A))、第二に、皮下に存在する線維化インスリンの沈着物に投与したインスリンが吸着する機構 (Fig. 44(B))、第三に、皮下に存在する線維化インスリンの沈着によって誘発された炎症細胞やインスリン分解酵素が、投与したインスリンを分解する機構 (Fig. 44(C))、第四に、皮下に存在する線維化インスリンの沈着物の表面に投与したインスリンが急速に線維化して析出し、線維化インスリンが成長する機構 (Fig. 44(D)) である。中村らは、インスリンボールを有するモデルマウスを作製し、インスリンの吸収障害機構は仮説2 (Fig. 41(B)) であり、吸着したインスリンが、インスリン注射の一定期間後に線維として成長していくと推察している[84]。

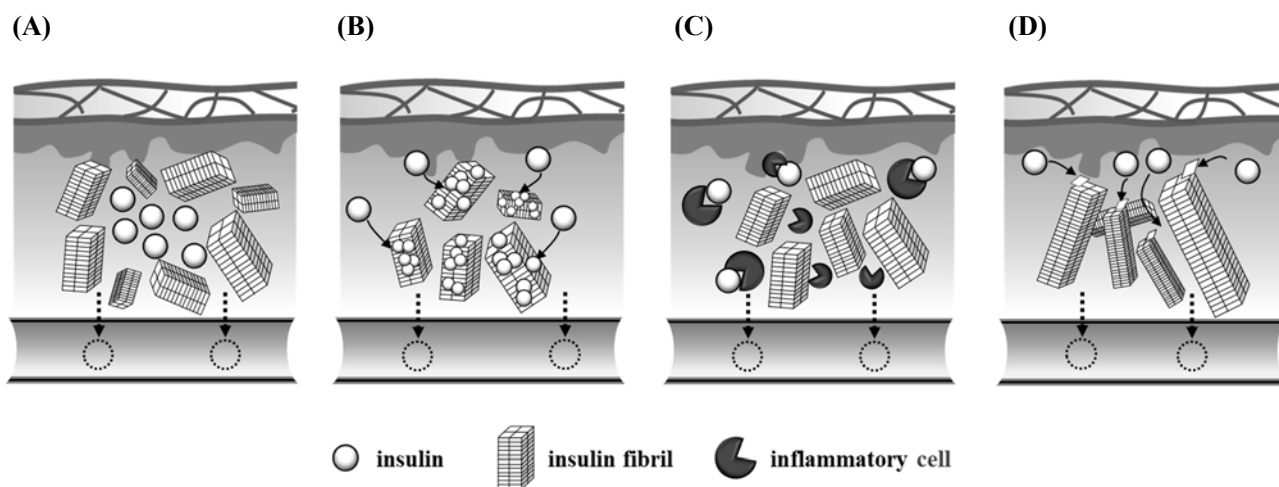


Fig. 44 Hypothesis about the mechanisms by which IDA inhibit insulin absorption into the bloodstream.

また、永瀬らは最近、硬い腫瘍の形成を伴わないIDAにおいても、インスリンの吸収低下を報告している[85]。IDA もしくはインスリンボールにおけるインスリンの吸収低下について詳細に検討した研究は、前述の報告を除くとほとんどなく、患者の状態の違いなどにより要因がさらに変化することも考えられ、さらなる研究が必要と思われる。

これらのことを背景として、本章では、皮下に線維化ヒトインスリンが存在するラットを、線維化したヒトインスリンを連続的に皮下投与することで作製し、同部位でのヒトインスリン(MW:5807)と FITC-Dextran(MW:10000, FD-10)の吸収性を比較するとともに、併せて血流量や血管透過性を評価し、IDA やインスリンボールにおけるインスリン吸収障害機構のさらなる理解と考察を試みた。皮下に投与されたヒトインスリンは、その会合状態により見かけの分子量が、5800～35000 程度まで変化するが、FD-10 は血流に吸収されるヒトインスリンモノマーもしくはダイマー程度の分子量を有し、かつ水溶性であるため、生体の他の成分と相互作用しないと考えられる。したがって、ヒトインスリンの吸収速度を FD-10 の吸収速度と比較することは、現象を理解する上で有用と考えられる。

第2節 線維化ヒトインスリン投与部位の状態の確認

線維化ヒトインスリンが存在する部位での、ヒトインスリンの吸収性を評価するために、あらかじめ *in vitro* で調製した線維化ヒトインスリンをラットの背部に皮下投与した。本節では投与に先立って行う、線維化ヒトインスリン投与部位の状態の確認として、1. 目視での観察、2. 線維化ヒトインスリン投与部位の血流量の評価を行った。また、それらと別に、線維化ヒトインスリン投与部位の血管透過性の評価と線維化ヒトインスリンの皮下での存在の確認を行った。

2-1. 線維化ヒトインスリンの皮下での存在確認

2-1-1. 線維化ヒトインスリン投与部位における血管透過性の評価

線維化ヒトインスリンまたは PBS を 1 日 1 回、2 週間、皮下投与したラットの 17 日目の血管透過性を評価した。血管透過性は、血漿タンパク質の漏出マーカーとして、広く使用されているエバンスブルーを用いて行った[86, 87]。エバンスブルーは、血漿タンパク質のアルブミンと高い親和性を有するため、血管透過性の亢進により血漿タンパク質の血管外への漏出が生じた際の指標になる。エバンスブルーの漏出を観察した結果、線維化ヒトインスリン投与部位で、著しいエバンスブルーの漏出が確認された (Fig. 45)。すなわち、PBS を 2 週間皮下投与した部位では、血管透過性の亢進は見られなかったのに対し、線維化ヒトインスリン投与部位では、炎症によるものと推察される血管透過性の亢進が見られた。

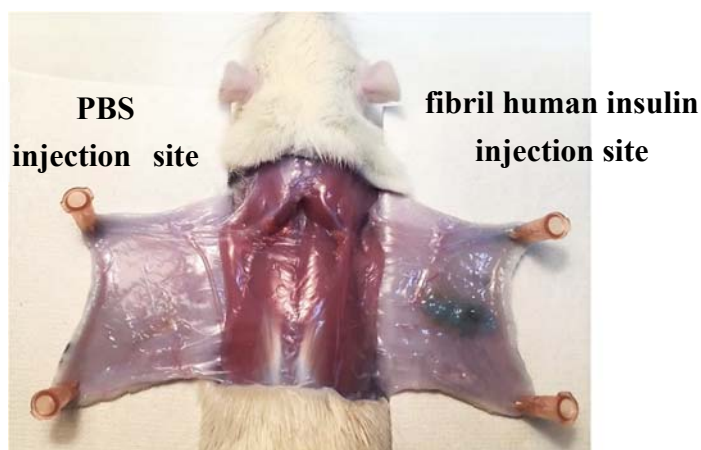


Fig. 45 Evaluation of blood vessel permeability at the site of PBS or fibril human insulin injection site.

2-1-2. 線維化ヒトインスリン投与部位の ThT 染色

線維化ヒトインスリンまたは PBS を 1 日 1 回、2 週間、皮下投与したラットの 17 日目に、イソフルラン麻酔下で大動脈を切断し、脱血した。その後、背部を切り、投与部位を摘出した。摘出後、投与部位を撮影し (Fig. 46(A))、ThT (100 μ M) に一晩浸漬した後、暗所で 365 nm の蛍光を照射した状態で再度撮影した (Fig. 46(B))。PBS 投与部位においても、同様に行った。

線維化ヒトインスリンまたは PBS を 1 日 1 回、2 週間、皮下投与したラットの皮下は、線維化ヒトインスリン投与部位でのみ、組織は硬くなっていないが、ヒトインスリンの線維化によると考えられる塊が観察された。さらに、線維化ヒトインスリン投与部位でのみ、ThT の蛍光応答が観察された (Fig. 46(B))。このことから、線維化ヒトインスリン投与部位に、線維化したヒトインスリンが存在しており、IDA が生じた状態に近い実験系を作成できたことが確認された。

(A) no treatment

(B) ThT staining

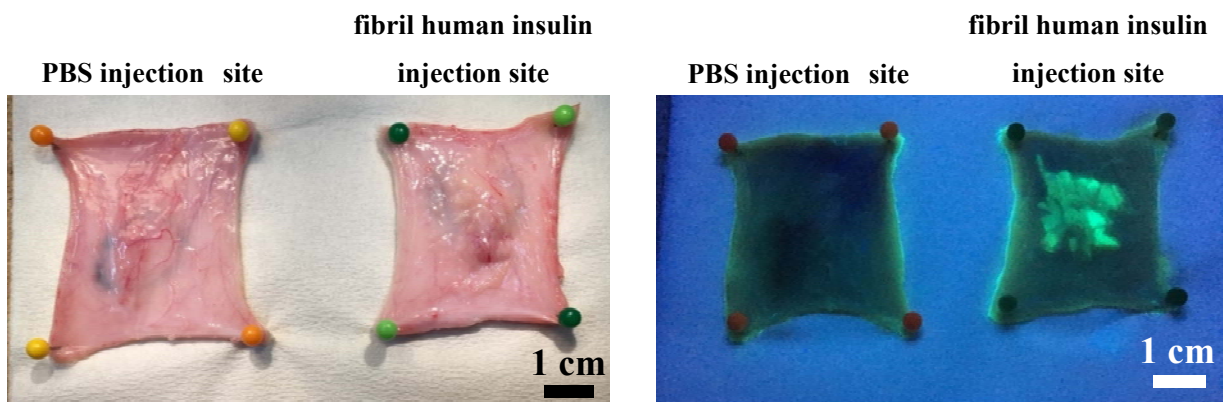


Fig. 46 Subcutaneous condition of PBS or fibril human insulin injection site.

2-1-3. 線維化ヒトインスリン投与部位のラマン分光測定

線維化ヒトインスリン投与部位に見られた塊に線維化ヒトインスリンが含まれていることを確認するため、その塊のみを組織から摘出後、ピンセットで可能な限り薄く延ばして、ガラスカバーにのせ、ラマン分光法を用いて、塊のラマン散乱を測定した。

線維化ヒトインスリン投与部位に見られた皮下塊では、 β 化していないヒトインスリンの部位 (1656.4 cm^{-1}) から、線維化ヒトインスリンの部位 (1673.8 cm^{-1}) の方向にシフトした 1665.6 cm^{-1} と 1669.2 cm^{-1} にピークが観察された (Fig. 47, Table 14)。このことから、皮下塊はヒトインスリンの線維化したものであるが、ピークが完全に線維化ヒトインスリンと一致しないことから、投与した線維化ヒトインスリン中に含まれていた未変化のヒトインスリンも一部検出されていると考えられた。

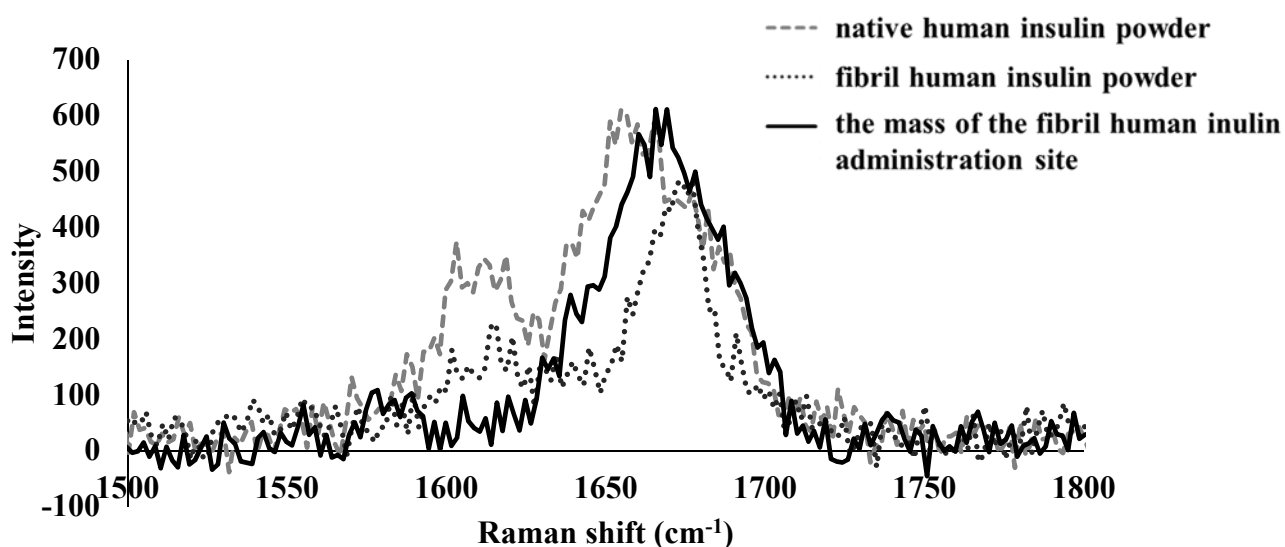


Fig. 47 Raman spectra of at the site of fibril human insulin injection site.

Table 14 Raman measurement of subcutaneous mass at fibril human insulin injection site.

native human insulin (α -helix)	fibril human insulin (β -sheet)	fibril human insulin injection site
1656.4 cm^{-1}	1673.8 cm^{-1}	1665.6 cm^{-1} 1669.2 cm^{-1}

2-2. 皮下投与した背部の目視での観察

線維化ヒトインスリンを1日1回、2週間、皮下投与したラットの背部外見(17日目)は、1日1回、2週間、PBSを投与した部位と比較して、明確な変化はなく、あきらかな腫瘍は確認されなかった(Fig. 48)。このことから、本研究の条件は、硬結したインスリンボールは形成されていない状況といえる。これらのラットに対して、ヒトインスリンとFD-10の投与を行った。

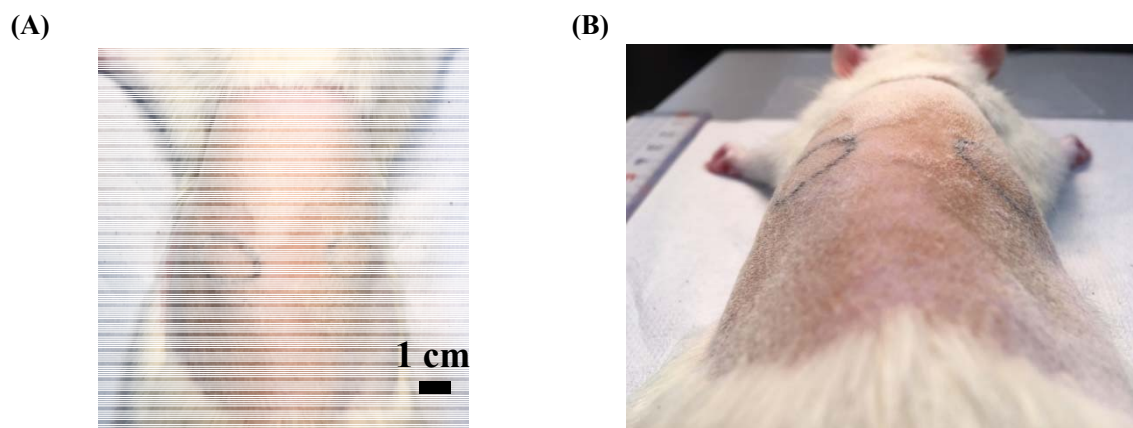


Fig. 48 Visual observation of the dorsal part administered subcutaneously.

2-3. 線維化ヒトインスリン投与部位の血流量の評価

線維化ヒトインスリンおよびPBSを1日1回、2週間、皮下投与したラットの14日目の血流量を評価した。イソフルラン麻酔下で測定した、線維化ヒトインスリンおよびPBS投与部位の血流量は、両部位で差が確認されなかった(Fig. 49)。

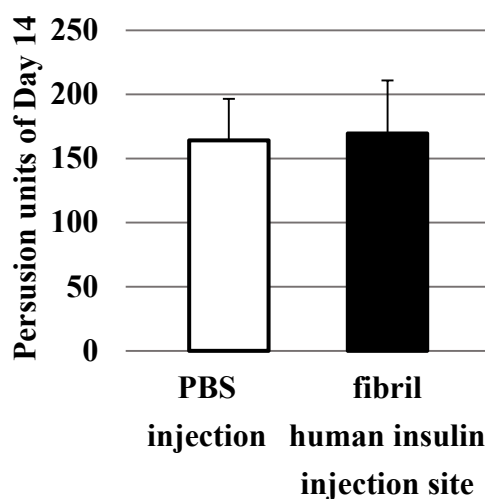


Fig. 49 Evaluation of blood flow at the site of fibril human insulin administration site.

Each value is expressed as the mean \pm S.D. (n=4-6).

第3節 線維化ヒトインスリン投与部位でのヒトインスリン吸収性の解析

PBS 投与部位と線維化ヒトインスリン投与部位に、FD-10 とヒトインスリンをそれぞれ皮下投与し、両者の吸収性を比較した。PBS 投与部位にヒトインスリンの製剤であるヒューマリン[®]R (12 nmol/kg) を、線維化ヒトインスリン投与部位に FD-10 (16.5 mg/kg) を皮下投与する群と、その逆の群の 2 群にラットを分けて、ヒューマリン[®]R と FD-10 を同じ個体に同時に皮下投与した。

FD-10 では、PBS 投与部位に投与した群と比べて、線維化ヒトインスリン投与部位に投与した群で有意に最高血中濃度 (C_{max}) が高かった (Fig. 50(C))。線維化ヒトインスリン投与部位では、2-1-1 で血管透過性の亢進が生じていたことが明らかとなっており、これにより、FD-10 の吸収が促進したと考えられる。一方、ヒトインスリンでは、PBS 投与部位に投与した群に比べて、線維化ヒトインスリン投与部位に投与した群で血中濃度時間曲線下面積 (AUC) が有意に低く、吸収が低くなることが示された (Fig. 50(D))。線維化ヒトインスリン投与部位では炎症によるものと推察される血管透過性が亢進しており、それにより水溶性高分子化合物の血流への移行が促進されたと考えられるが、線維化ヒトインスリン投与部位は、血管透過性の亢進という、吸収に対して正に働く状況下であるにも関わらず、ヒトインスリン自体の血流への移行は低下した。この結果から、線維化ヒトインスリンの存在はヒトインスリンの移動抑制に特異的に作用していると考えられ、既に臨床で報告されている IDA におけるインスリンの吸収障害機構を理解する上で、重要な知見である。この現象を考察するために、線維化ヒトインスリンとヒトインスリンの膜透過の過程における相互作用を評価した。

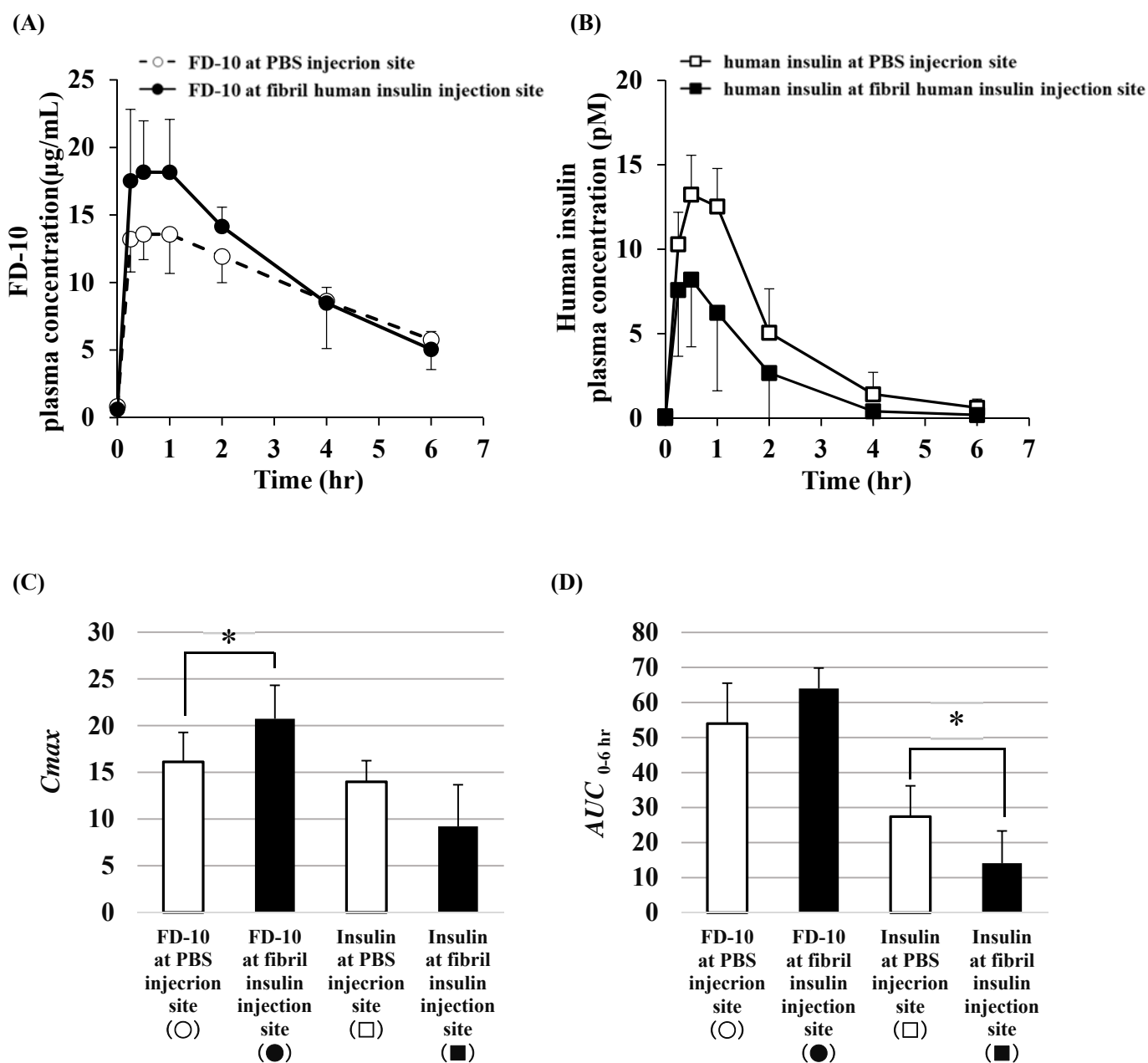


Fig. 50 Absorption after subcutaneous injection of FD-10 and human insulin to PBS injection site and fibril human insulin injection site.

Each value is expressed as the mean \pm S.D. (n=7). * $P < 0.05$ calculated using Student's t-test.

第4節 線維化ヒトインスリンによるヒトインスリンの吸収障害機構の理解

第3節で得られた、線維化ヒトインスリン投与部位におけるFD-10とヒトインスリンの吸収性の違いを考察するために、横型拡散セルを用いて、膜中に線維化ヒトインスリンが存在した際のヒトインスリンの透過性の変化を評価できる実験系を作製した。すなわち、横型拡散セルのセル間に、でんぷん粉末で希釈した線維化ヒトインスリン粉末を、セルロースアセテート製のメンブレンフィルター（孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ ）2枚で挟んで設置した（Fig. 51）。線維化ヒトインスリン粉末含有でんぷん粉末を膜間に挟んだ場合に生じる物理的障壁や有効透過面積の違いを補正するために、ヒトインスリンとFD-10を同時適用した。

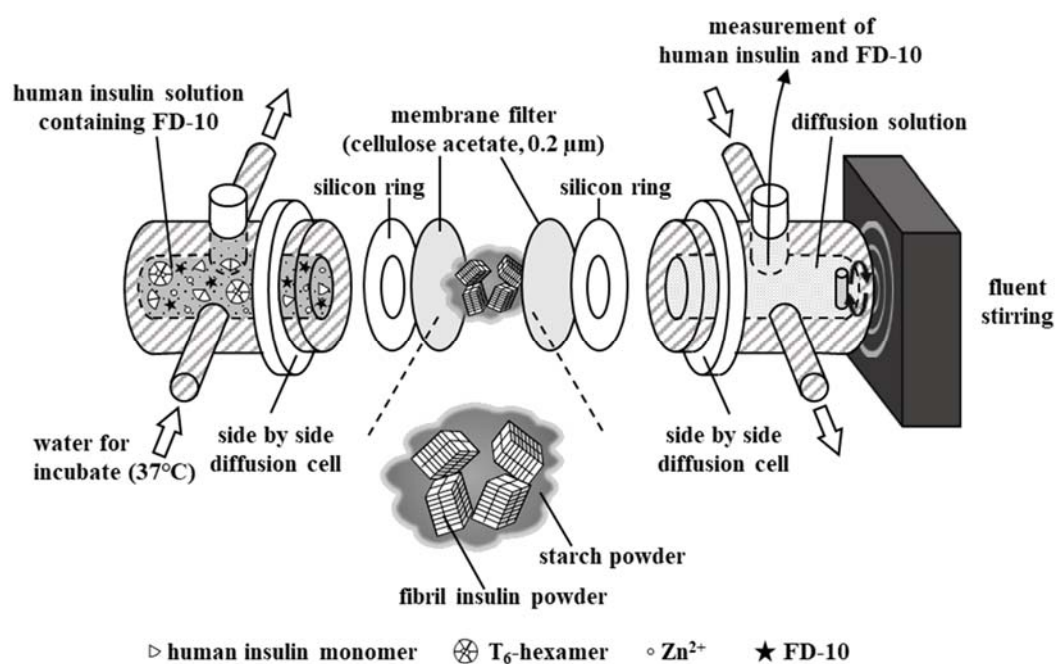


Fig. 51 Experimental device for evaluating the interaction between fibril human insulin and human insulin.

線維化ヒトインスリンが膜間に存在することで、ヒトインスリンの透過性は減少し、20%線維化ヒトインスリン粉末含有でんぷん粉末においては、全く透過が起こらなかった (Fig. 52)。このことから、拡散の過程において線維化ヒトインスリンにヒトインスリンが吸着することにより捕捉され、移動可能なヒトインスリン濃度が低下することが推察された。ヒトインスリンが未変化体のまま、線維化ヒトインスリンに吸着しているのか、ヒトインスリンが α から β 構造に変化して吸着しているのか、吸着後に時間の経過によって構造変化が起きているのかは、現時点では明らかではないが、*in vivo* でのヒトインスリンの吸収障害は、線維化ヒトインスリンにヒトインスリンが捕捉されることで生じていることは明らかである。

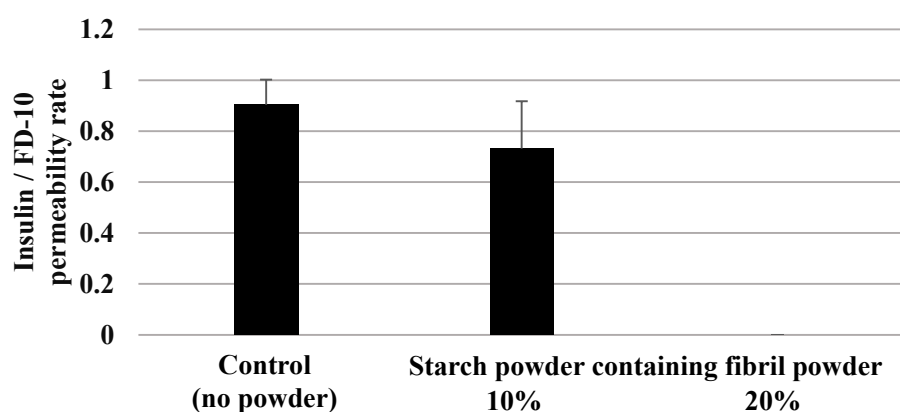


Fig. 52 Human insulin permeability corrected by FD-10.

Each value is expressed as the mean \pm S.D. (n=3-8).

第5節 小括

患者において問題となっているインスリン吸収障害機構のうち、目視で確認可能なインスリンボールを有する患者におけるインスリン吸収障害は、アミロイド沈着による組織の硬結が関係していると推察されているが、まだ十分に解明されていない。その一方で、最近では、組織が硬化しておらず、目視で確認できない IDA においてもインスリンの吸収低下が明らかとなった。そこで本章では、皮下に線維化ヒトインスリンが存在するラットを作製し、ヒトインスリンと FD-10 の吸収性を比較することで、インスリン吸収障害機構のさらなる理解を試みた。

In vitro で調製した線維化ヒトインスリンを、ラットに2週間皮下投与することで、皮下に線維化ヒトインスリンが存在するラットを作製できた。その際、明確な硬い腫瘍は形成していなかった。コントロールとして PBS を2週間皮下投与した部位では、血管透過性の亢進は見られなかったのに対し、線維化ヒトインスリン投与部位では、炎症によるものと推察される血管透過性の亢進が見られた。両部位の血流量に差は確認されなかった。

PBS 投与部位と線維化ヒトインスリン投与部位に、FD-10 とヒトインスリンをそれぞれ皮下投与し、両者の吸収性を比較した。FD-10 では、PBS 投与部位に投与した群に比べて線維化ヒトインスリン投与部位に投与した群での吸収が高く、一方、ヒトインスリンでは、PBS 投与部位に投与した群に比べて線維化ヒトインスリン投与部位に投与した群での吸収が低い結果となった。線維化ヒトインスリン投与部位では血管透過性の亢進により、FD-10 の吸収促進が生じたと考えられる。それにも関わらず、ヒトインスリンで吸収が低下することは、血管透過性の亢進という、吸収に対して正に働く状況下においても、線維化したヒトインスリンの存在により、ヒトインスリンの血流への移行が低下したというこの結果は、IDA においてもインスリンの吸収が低下するという現象を理解する上で、重要な知見である。

In vivo での現象を考察するために、*in vitro* で、横型拡散セルのセル間に、線維化ヒトインスリン粉末含有でんぷん粉末をメンブレンフィルター2枚で挟みこんで設置し、一方のセルに入れたヒトインスリンと FD-10 の透過性を比較した。線維化ヒトインスリンが存在することで、ヒトインスリンの透過性は、FD-10 の透過性に比べて減少した。

これらの結果を合わせると、*in vivo* において線維化ヒトインスリン投与部位では血管透過性の亢進により、水溶性高分子化合物が吸収されやすくなっている一方、ヒトインスリンの場合、線維への自身の吸着により、拡散・移動可能なヒトインスリンの濃度が減少してヒトインスリンの吸収抑制が生じたと考えられる。

結論

インスリン療法の合併症として近年問題視されているのが、注射されたインスリンが注射部位で線維化(アミロイドタンパク質に変化)して皮下に沈着した IDA と沈着により皮下に腫瘍が生じたインスリンボールである。これらは、同一部位へのインスリンの繰り返し投与によって生じると考えられており、インスリンの吸収障害による血糖コントロールの悪化を招く。本研究では、インスリンの線維化に関わる要因を解明するために、実際に臨床で使用されている製剤を用いて、インスリンの線維化に及ぼす製剤中添加剤の影響や、製剤中での会合状態、化学構造の違いに着目した。また、IDA およびインスリンボールを回避できる新規インスリンの検討、IDA およびインスリンボールによるインスリンの吸収抑制作用の考察など、臨床での問題から製剤開発までの広い範囲に視点を当て、基礎的な研究を行った。

第 1 章では、ヒトインスリンの製剤であるヒューマリン®R の線維化要因に関して、線維化結晶共存下での線維形成性と、ヒューマリン®R 中の添加剤や pH の変化が線維化に与える影響を *in vitro* で評価した。その結果、物理的刺激により促進されるヒトインスリンの線維化は、線維化結晶の共存により、物理的刺激が弱い条件においても進行し、線維化結晶が核として機能することを明らかにした。この結果から、製剤中で一度、線維が形成されると、物理的刺激がなくとも容易に線維化が進行するため、線維が形成されないように保存中や使用中は十分に注意する必要がある。また、生体内においても、皮下に一度、線維が生じることで、注射されたインスリンが容易に線維化する可能性があることが推察された。例えば、製剤を輸送する際の振動などの刺激によっても線維形成が促進される可能性があるため、薬剤師が患者に渡す前に製剤の外観を十分に確認する必要がある。そのほか、服薬指導の際には、血糖値や低血糖の有無などを確認するだけでなく、製剤をどのように扱っているか、使用している製剤の外観に変化が生じていないかなどを、インスリンの使用歴に関わらず、患者に聞くことも大切であると考ええる。

ヒトインスリンの製剤であるヒューマリン®R 中の亜鉛イオンや *m*-クレゾールなどの添加剤が時間とともに消失していく *in vitro* 実験系で線維化の過程を評価した結果、それらは、製剤の保存中における線維化において重要な役割を果たしていた。*m*-クレゾールは線維化に抑制的に働くこと、亜鉛イオンの消失は *m*-クレゾールの消失により起こりやすくなることを明らかにした。*m*-クレゾールと亜鉛イオンの消失により、ヒトインスリンは会合状態からモノマーへと変化し、そのことが線維化の促進につながったと考えられる。製剤から動的に *m*-クレゾールや亜鉛イオンなどの添加剤が消失する拡散セルを用いた実験系で、*m*-クレゾールなどの濃度低下が起きている膜近傍でアミロイド線維を含むゲルが生じた。局所でのヒトインスリンを含む各成分の濃度変化や周囲環境の変化は、*in vivo* の注射部位でも、各成分の拡散や体液による希釈によって同様に生じ、治療を受けている患者の皮下において IDA やインスリンボールが生じる際に、同様な現象が引き金となる可能性があると考えられた。

製剤中の pH が時間とともに変化する拡散セルを用いた実験系においては、中性付近の pH が維持された状態では、線維化が進行しやすく、一方、等電点付近の pH に変化する系では、時間と

ともに線維化よりも等電点沈殿物の析出が生じていくことが示された。ヒトインスリン製剤のヒューマリン®R の pH は 7.0～7.8 と規定されているが、保存中に pH が変化してしまうことも考えられ、保存中の pH 変化と製剤の安定性の関係には注意が必要である。

本章で作製した拡散セルを用いた実験系は、製剤を入れたセルと膜を隔てて分けられているもう一方のセルに、さまざまな溶液を適用することで、インスリンの線維化に対する添加剤や溶媒、pH の影響を、経時的に調べることが可能である。この動的過程は制御可能であり、膜を替えれば、反応速度を簡単に調節できる。さらに、この実験系は、生体内における皮下でのインスリンの状態をシミュレートするモデル系としても使用できる。このように、拡散セルを用いた本実験系は複数の利点を有しており、ひとつの実験系において、目的に合わせて適用する溶液や膜を選択することで、様々な事象を評価できる実験系を構築できた。

第2章では、第1章を踏まえた上で、各種持効型インスリンの線維化の比較と、持効型インスリンの線維化に対するヒトインスリンの線維化結晶の影響を調べ、さらに、アミロイドーシスを回避可能な新規インスリン誘導体として、糖への結合能を有する PBA をヒトインスリンに修飾し、その血糖降下作用と線維化能を調べた。

レベミル®原液をラットの背部の同一部位に、3 週間皮下投与した結果、皮下にアミロイドーシスが生じていた。臨床では、インスリンの使用歴が数年から数十年の患者にインスリンボールが発見されること多い。これは実験動物から得られた結果ではあるものの、臨床で考えられている長期的な使用でなくとも、短期間で IDA やインスリンボールが生じている可能性があることが示唆された。薬剤師は、IDA やインスリンボールの予防のために、患者のインスリンの使用年数に関わらず、短期間でも IDA やインスリンボールが生じる可能性があることを把握し、その上で患者に服薬指導を行う必要がある。

In vitro での実験の結果、持効型製剤原液の線維化速度は製剤によって異なっており、製剤中にモノマーが多いものは速く、ヘキサマーやダイヘキサマーの形成率が高いものは遅い傾向にあることを明らかにした。その中でも、他と比べて著しく線維化が遅かったトレシーバ®について、製剤中添加物を除き、その主薬であるインスリンデグルデク自体の線維化を評価した結果、製剤原液に比べて著しく線維化が促進された。添加剤が存在しないインスリンデグルデクではモノマーの比率が増加していたことから、トレシーバ®の線維化に対する耐性は、安定なダイヘキサマーとして存在すること、*in vivo* においてトレシーバ®は、マルチヘキサマーの形成後、低分子である添加剤が高分子のインスリンデグルデクよりも速く拡散消失し、その後徐々にモノマーを生じて吸収されるため、臨床において、線維化しにくい有用な製剤であるとまでは言いきれないことを明らかにした。

持効型インスリンの線維化は、ヒトインスリンの線維核の存在によって、物理的刺激が弱い条件でも促進されることが *in vitro* の系で明らかとなり、また同様の結果は、*in vivo* でも観察された。異種製剤間においても、線維化が促進されることから、臨床で、患者に IDA やインスリンボールが疑われた場合、別の製剤に変更することによって、それらの進行を抑制しようとする試みはあまり期待できないことが明らかとなった。このことから、IDA やインスリンボールが疑われた場合は、投与部位の変更が、それらの進行抑制と適切な治療を行う上で、現状最も有効な方法であると考えられる。

そのほかに、今後、新たに IDA やインスリンボールが形成されないように、薬剤師が患者に、インスリンを同一部位に投与しないように働きかけることや、こまめに投与の仕方について患者に聞くことが大切であると考ええる。

アミロイドーシスを生じない新規インスリン誘導体として、糖鎖結合能を有する PBA-Ins を合成した。PBA 修飾数は平均 2 個で、A 鎖の N 末端 (A1) と B 鎖の N 末端 (B1) に主に修飾されていること、静脈内投与および皮下投与において血糖降下作用を示し、静脈内では赤血球に結合することで作用持続性を有していることを明らかにした。PBA-Ins は、*m*-クレゾールの非存在下でも、*in vitro* において線維化が進行しにくく、PBA-Ins のモノマー含有率はヒトインスリンと同等であったことから、A 鎖 B 鎖の N 末端への修飾は β 構造形成に抑制的に働き、線維化を防ぐのに効果的であることを明らかにした。*In vivo* での PBA-Ins のアミロイドーシスの形成性に関しては、本研究では未検討であるが、*in vitro* において *m*-クレゾールの非存在下でも線維化が進行しにくいという性質は、製剤の保存中において線維化が進行しにくい製剤を開発する上で役に立つ結果である。

第 3 章では、線維化ヒトインスリンが皮下に存在するラットを作製し、同部位でのヒトインスリン (MW:5807) と FD-10 (MW:10000) の吸収性を比較するとともに、血流量や血管透過性を評価することで、IDA やインスリンボールにおけるインスリン吸収障害機構の解明を試みた。

In vitro で調製した線維化ヒトインスリンを、ラットに 2 週間皮下投与することで、明確な腫瘍は形成していないが、皮下に線維化ヒトインスリンが存在するラットを作製できた。このラットを用いた研究で、FD-10 の吸収は、対照の PBS 投与部位に投与した群に比べて線維化ヒトインスリン投与部位に投与した群で高かった。一方、ヒトインスリンの吸収は、PBS 投与部位に投与した群に比べて線維化ヒトインスリン投与部位に投与した群で低い結果となった。PBS を 2 週間皮下投与した部位では、血管透過性の亢進は見られなかったのに対し、線維化ヒトインスリン投与部位では、炎症によるものと推察される血管透過性の亢進が見られた。両部位の血流量には差が確認されなかったため、線維化ヒトインスリン投与部位では血管透過性の亢進により、FD-10 の吸収促進が生じたと考えられた。また、血管透過性の亢進という、吸収に対して正に働く状況下であるにも関わらず、ヒトインスリンの吸収が低下したことから、線維化ヒトインスリンの存在自体がインスリンの吸収を抑制していると考えられた。そこで、この吸収抑制の再現を *in vitro* の実験系で試み、線維へのヒトインスリン分子の吸着により、拡散・移動可能なヒトインスリンの濃度が減少し、ヒトインスリンの吸収抑制が生じていることを明らかにした。

IDA やインスリンボールを回避するために取り組むべき検討はまだ多く残されているが、ヒトインスリンおよび持効型インスリンの線維化についていくつかの新しい知見を得た。これらの結果は、インスリン治療を行っていく上で IDA やインスリンボールが生じないように、また、生じた場合でも安定かつ有効な治療を継続していく上で重要な情報となる。それだけでなく線維化かつアミロイドーシスを生じにくいインスリン誘導体の開発にもつながると期待できる。インスリンを調剤し、服薬指導をする薬剤師は、IDA やインスリンボールが生じないように患者に働きかけることができる存在であり、かつ IDA やインスリンボールにいち早く気づくことができる存在であるため、本研究から得られ

た知見を、薬剤師に情報提供していくことは重要だと考えている。

謝辞

本研究は、城西大学大学院薬学研究科薬学専攻薬剤学講座および薬品物理化学講座にて行われたものであります。本研究を遂行するにあたり、ご助力頂きました各方々の先生方、城西大学大学院薬学研究科薬剤学講座および城西大学薬学部薬学科薬剤学研究室の学生方、城西大学大学院薬学研究科薬品物理化学講座を修了された先輩方および城西大学薬学部薬学科薬品物理化学研究室を修了された学生方に感謝の意をここに表します。

城西大学大学院薬学研究科薬剤学講座教授 関 俊暢 先生におかれましては、自分の好きなようにやりなさいと言っていただき、多くの経験と省察、学びと試行を繰り返すことができました。思いが強く不器用な私が、このような形で研究をまとめるに至れたのは、壁や問題に直面した際に、示唆に富んだ的確なご指導、ご助言をしてくださったことによるものであり、研究以外の面でも、手を差し伸べ、言葉を語りかけ、常に道を示してくださったおかげであります。

城西大学大学院薬学研究科薬品物理化学講座准教授 江川 祐哉 先生におかれましては、根本的な実験手技や研究の面白さを教えていただき、私が研究に打ち込むきっかけと、さらには本研究テーマに着手するきっかけを与えてくださいました。

日本赤十字社医療センター薬剤部長 細谷 治 先生におかれましては、薬学研究者かつ薬剤師としての視点・視座を持って研究することの大切さを教えていただきました。

城西大学大学院薬学研究科薬品物理化学講座助教 三木 涼太郎 先生におかれましては、学会の要旨やポスター等を細部に至るまで見ていただき、研究内容への的確な指摘や表現方法をご指導いただきました。また、研究室の運営等に関しても、大変ご助力いただき、快適な研究生活を送ることができました。

奥羽大学薬学部薬剤学分野講師 杉野 雅浩 先生におかれましては、どんな時も研究を楽しむことを忘れずにと言っていただき、研究で壁に直面した際に大変励みになりました。

城西大学薬学部薬学科薬剤学研究室助教 関 智宏 先生および城西大学薬学部薬学科教育支援室助教 小島 裕 先生におかれましては、確かな経験と知見に基づき、研究だけに留まらず、研究生活や後輩の指導法など多くの相談にのっていただきました。

城西大学大学院薬学研究科薬剤作用解析学講座教授 小林 大介 先生におかれましては、薬剤師として病院で勤務された経験から、基礎と臨床の両方の観点からの的確なご指摘をいただきました。

城西大学大学院薬学研究科生理学講座教授 加園 恵三 先生におかれましては、医師の立場から、臨床の生の声と多くの知見をご教授いただきました。

城西大学大学院薬学研究科薬品作用学講座教授 岡崎 真理 先生におかれましては、生物学的な実験結果および手技に関して、有益なるご助言をいただきました。

城西大学理学部化学科ナノ機能化学研究室准教授 宇和田 貴之 先生におかれましては、ラマン分光測定にご協力いただき、本研究結果のエビデンスレベルを高めることができました。

城西大学大学院薬学研究科生化学講座教授 畑中 朋美 先生におかれましては、動物実験手技をご指導いただき、血糖降下作用を評価することができました。

城西大学大学院薬学研究科生物有機化学講座教授 杉田 義昭 先生および城西大学大学院薬学研究科分子栄養学講座教授 清水 純 先生におかれましては、本論文作成および学位論文審査にあたり、ご教授とご校閲を賜りました。

城西大学機器分析センターの皆様におかれましては、日々の廃棄物処理や安全管理をしていただき、安全に実験を遂行できただけでなく、徹底した機器管理により滞りなく実験を実施でき、原子吸光光度計や円二色性分散計、MALDI TOF-MS を用いて、本研究において要となるデータを取ることができました。

城西大学水田記念図書館の皆様におかれましては、私の図書リクエストに応じて、本研究に関する図書を多数購入していただいた他、多くの文献を取り寄せていただき、本研究に関して知見を深めることができました。

最後に、本研究のために尊い命をいただきました動物たちに深く感謝し、追悼の意を表します。

実験の部

第1章 実験の部

1. 実験材料

ヒューマリン[®]R は、ヒューマリン[®]R 注 100 単位/mL (1 バイアル 10 mL 中ヒトインスリン(遺伝子組換え) 1000 単位含有)を用い、日本イーライリリー株式会社(兵庫)から購入した。塩化ナトリウム(試薬特級)、リン酸水素二ナトリウム(試薬特級)、リン酸二水素カリウム(試薬特級)、リン酸二水素ナトリウム二水和物(試薬特級)、グリシン(試薬特級)、塩酸(試薬特級)、水酸化ナトリウム(粒状、和光一級)、チオフラビン T (ThT)、亜鉛標準液 (Zn 1000) は、富士フィルム和光純薬(大阪)から購入した。*m*-クレゾールは、東京化成株式会社(東京)から購入した。塩化カリウム(特級)は、関東化学株式会社(東京)から購入した。生理食塩液は、大塚生食注を用い、株式会社大塚製薬工場(徳島)から購入した。アンモニア水は富山薬品工業株式会社(東京)から購入した。

2. 使用機器

ThT の蛍光測定には、蛍光光度計 (RF-5300PC, 島津製作所株式会社, 京都)を使用した。濁度測定には、紫外可視吸光度計(U-3000, HITACHI, 東京)を使用した。*m*-クレゾールの測定には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC, フォトダイオードアレイ検出器: MD-4015, カラムオーブン: CO-4061, オートサンプラー: AS-4150, ポンプ: PU-4180, 日本分光株式会社, 東京)を使用した。亜鉛イオンの測定には、原子吸光分光光度計 (AA-6200, 島津製作所株式会社)を使用した。旋回振盪には、振盪機マルチシェーカー (MMS-300e、株式会社アイラコーポレーション、東京)を使用した。

3. リン酸塩緩衝生理食塩液 (PBS, pH 7.4, pH 6.5, pH 5.5) の調製

Table S1 に示した組成の水溶液 A および B を pH 7.4、pH 6.5、pH 5.5 になるように混合した。

Table S1 Composition of PBS (pH 7.4, pH 6.5, pH 5.5).

	Reagent	Concentration
solution A	sodium chloride (NaCl)	137 mM
	potassium chloride (KCl)	2.68 mM
	sodium hydrogen phosphate (Na ₂ HPO ₄)	10 mM
solution B	sodium chloride (NaCl)	137 mM
	potassium chloride (KCl)	2.68 mM
	potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	10 mM

4. リン酸塩緩衝液 (50 mM, pH 7.4) の調製

Table S2 に示した組成の水溶液 A および B を pH 7.4 になるように混合した。

Table S2 Composition of phosphate-buffer.

	Reagent	Concentration
solution A	sodium dihydrogen phosphate dihydrate	50 mM
solution B	sodium hydrogen phosphate	50 mM

5. バイアルを用いた線維化試験の条件設定

バイアル (6 mL) に、ヒューマリン®R (5 mL) を入れ、37℃ のインキュベーター内で、30 rpm で旋回振盪もしくは 850 rpm で攪拌 (攪拌子 15 mm×5 mm) した。72 時間まで所定の時間に濁度測定 (第 1 章の 10.) と ThT 蛍光測定 (第 1 章の 11.) を行った。

6. ヒトインスリンの線維化における線維化結晶共存の影響

バイアル (6 mL) に、ヒューマリン®R (1 mL) とリン酸塩緩衝液 (50 mM, pH 7.4, 4 mL) を入れ、37℃ のインキュベーター内で、850 rpm で攪拌 (攪拌子 15 mm×5 mm) し、ヒトインスリンの線維化結晶溶液を調製した。続いて、別のバイアル (6 mL) に、ヒューマリン®R (900 µL) とリン酸塩緩衝液 (50 mM, pH 7.4, 3.6 mL) を入れ、そこに、先に調製したヒトインスリンの線維化結晶溶液 (500 µL) を添加し、37℃ のインキュベーター内で、30 rpm で旋回振盪し、72 時間まで所定の時間に濁度測定 (第 1 章の 10.) と ThT 蛍光測定 (第 1 章の 11.) を行った。

7. ヒトインスリンの線維化における希釈の影響

バイアル (6 mL) に、ヒューマリン®R (1 mL) と PBS (pH 7.4, 4 mL) を入れ、37℃ のインキュベーター内で、850 rpm で攪拌 (攪拌子 15 mm×5 mm) し、72 時間まで所定の時間に濁度測定 (第 1 章の 10.) と ThT 蛍光測定 (第 1 章の 11.) を行った。

8. ヒトインスリンの線維化における製剤中添加剤の影響

横型拡散セルの一方にヒューマリン®R (3.3 mL) を入れ、もう一方には、拡散溶液として製剤から添加剤が消失していくように生理食塩液 (①) を、もしくは、製剤から *m*-クレゾールが消失しないように、製剤と同濃度になるように *m*-クレゾールを添加した生理食塩液 (②) を、製剤側セルと同程度の高さになる容量を入れた。製剤と同濃度の *m*-クレゾールを含有した生理食塩液は、*m*-クレゾール (241.7 µL) をメスフラスコ (100 mL) に入れ、大塚生食注でメスアップして調製した。拡散溶液は、6, 12, 18, 24, 36, 48, 60 時間で全量を交換した。ヒューマリン®R を入れたセルから、所定の時間に濁度測定 (第 1 章の 10.) と ThT 蛍光測定 (第 1 章の 11.) を行った。拡散溶液を入れたセルから

は、所定の時間に全量交換した溶液中の *m*-クレゾールを第 1 章の 12. に従って測定し透過量を求め、製剤中の *m*-クレゾールの残存率を算出した。

亜鉛イオンの測定は、亜鉛イオンの測定のみを行う実験として単独で行った。拡散溶液の全量交換は上記と同時間に行ったが、ヒューマリン®R を入れたセルの ThT 測定および濁度測定は行っていない。72 時間におけるヒューマリン®R を入れたセル中の亜鉛イオン濃度を第 1 章の 13. に従って測定し、製剤中の亜鉛イオンの残存率を算出した。

9. ヒトインスリンの線維化における製剤中 pH の影響

横型拡散セルの一方にヒューマリン®R を入れ、もう一方には、拡散溶液として、pH 7.4、pH 6.5、pH 5.5 の PBS を入れた。拡散溶液の全量交換、ThT 蛍光測定と濁度測定は第 1 章の 8. と同様に行い、加えて、ヒューマリン®R を入れたセルの pH を所定の時間に測定した。

10. 濁度測定

濁度を測定することで、不溶性の析出物の生成を判定した。バイアルを用いた実験ではバイアル中から、拡散セルを用いた実験ではヒューマリン®R を入れたセルから、サンプル (2.5 mL) を採取し、希釈せずに二面透明石英キュベット (セル長 1 cm) に入れ、Table S3 に示す条件で濁度 (600 nm) を測定した。測定後、キュベットに入れたサンプルはバイアルまたは拡散セルに戻した。

Table S3 Measurement conditions for turbidity measurement.

wavelength	600 nm
measurement mode	quantitative calculation
initial wait time	20 sec
slit	4 nm
measurement temperature	37℃

11. ThT 蛍光測定

ThT の蛍光強度を測定することで、ヒトインスリンのアミロイド線維の生成を判定した。蒸留水で調製した ThT 溶液 (1 mM) をストック溶液とし、測定前にグリシン緩衝液 (50 mM, pH 9.5) で 200 倍希釈した (5 μ M)。グリシン緩衝液は、蒸留水で溶解させたのち、水酸化ナトリウム (1 M) を加えて、pH 9.5 に調整した。

バイアルを用いた実験ではバイアル中から、拡散セルを用いた実験ではヒューマリン®R を入れたセルから、サンプル (15 μ L) を採取し、ThT 溶液 (5 μ M, pH 9.5, 3 mL) を入れた四面透明石英キュベット (セル長 1 cm) に加え、ピペッティング後、Table S4 に示す条件で蛍光強度を測定した。

Table S4 Measurement conditions for ThT fluorescence measurement.

excitation wavelength	444 nm
emission wavelength	485 nm
measurement mode	quantitative measurement
scan speed	fast
bandwidth	excitation 3 nm emission 3 nm
detection range	high
measurement temperature	room temperature

12. *m*-クレゾールの定量

拡散セル実験において全量交換した際の溶液のうち 100 μ L を、アセトニトリルで溶解した内部標準物質の 4-ヒドロキシ安息香酸メチル溶液 (2 mM, 100 μ L) と混合し、15000 \times g、5 分、25 $^{\circ}$ C で遠心した。その上清 A (100 μ L) を蒸留水 (100 μ L) と混合し、15000 \times g、5 分、25 $^{\circ}$ C で遠心した後、得られた上清 B を、Table S5 の条件で HPLC を用いて分析した。

ヒューマリン[®]R 中の *m*-クレゾールは除タンパク後に、内部標準物質と混合し測定した。すなわち、ヒューマリン[®]R (200 μ L) を、アセトニトリル (800 μ L) と混合後、4 $^{\circ}$ C で 15 分間静置し、15000 \times g、5 分、25 $^{\circ}$ C で遠心し、上清 C を得ることで除タンパクを行った。続いて、上清 C (100 μ L) を Table S5 に示した移動相 (100 μ L) と混合し、15000 \times g、5 分、25 $^{\circ}$ C で遠心後、上清 D (100 μ L) とアセトニトリルで溶解した内部標準物質の 4-ヒドロキシ安息香酸メチル (2 mM, 100 μ L) を混合し、その混合溶液 (100 μ L) をインサートに入れ、Table S5 の条件で HPLC を用いて分析した。検量線は、移動相で調製した *m*-クレゾール (20 mM, 100 μ L) を、移動相で希釈し、各種濃度の *m*-クレゾール溶液をアセトニトリルで溶解した内部標準物質の 4-ヒドロキシ安息香酸メチル溶液 (2 mM, 100 μ L) と混合し、測定した。

Table S5 Measurement conditions for *m*-cresol.

mobile phase	water containing 25% acetonitrile
flow rate	1.2 mL/min
column	C18 column (Mightysil, RP-18 GP 150-4.6 mm, 5 μ m)
column oven	60 $^{\circ}$ C
detector	photo diode array detector 214 nm
injection volume	5 μ L
internal standard	methyl-4-hydroxybenzoate

13. 亜鉛イオンの定量

拡散セル実験において、72 時間におけるヒューマリン[®]R を入れたセル中の溶液全量 (3.3 mL) を、メスフラスコ (50 mL) に入れ、蒸留水で調製したアンモニア水 (10%) でメスアップし、亜鉛イオン濃度を Table S6 に示した条件で原子吸光光度計を用いて測定した。ヒューマリン[®]R 中の亜鉛イオン濃度の測定は、ヒューマリン[®]R (3.3 mL) をメスフラスコ (50 mL) に入れ、アンモニア水 (10%) でメスアップして同様に測定した。検量線は、亜鉛標準液 (Zn 1000) を蒸留水で調製したアンモニア水 (10%) を希釈し、測定した。

Table S6 Measurement conditions for zinc ion.

fuel gas	acetylene
oxidant gas	air
hollow cathode lamp	zinc
detection wavelength	213.9 nm

14. 統計処理

すべてのデータは、平均値 \pm 標準偏差 (S.D.) として示し、すべての統計分析は、BellCurve for Excel (SSRI、東京、日本) を使用して計算した。統計的有意性は、1 群および 2 群間の Student's t test を適用して評価し、 $P < 0.05$ の値で有意とした。

第2章 実験の部

1. 実験材料

ランタス[®]は、ランタス[®]注 100 単位/mL (1 バイアル 10 mL 中インスリングルルギン(遺伝子組換え)1000 単位含有)を用い、サノフィ株式会社(東京)から購入した。レベミル[®]はレベミル[®]注 ペンフィル[®](1 カートリッジ 3 mL 中インスリンデテミル(遺伝子組換え)300 単位含有)を、トレシーバ[®]はトレシーバ[®]注 ペンフィル[®](1 カートリッジ 3 mL 中インスリンデグルデク(遺伝子組換え)300 単位含有)を用い、ノボノルディスクファーマ株式会社(東京)から購入した。ヒトインスリンは、インスリン、ヒト、組換え体(細胞培養用)を用い、ジメチルスルホキシド(超脱水、有機合成用)、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS, 生化学用)、トリプシン、ブタ膵臓由来、質量分析グレード(プロテオーム研究用)、(±)-ジチオトレイトール(分子生物学用)、ポリエチレングリコール 1000(和光一級)、ポリエチレングリコール 4000(和光一級)、ヨウ化ナトリウム(和光特級)、トリフルオロ酢酸(TFA, 試薬特級)、アセトニトリル(高速液体クロマトグラフ用)、アセトニトリル(LC/MS 用)、D(+)-グルコース(試薬特級)、グルコースキット グルコース C₁₂-テストワコーは富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。炭酸水素アンモニウム(一級)は、純正化学株式会社(東京)から購入した。ヨードアセトアミド、トリブチルアミン、クロロギ酸イソブチルは、東京化成株式会社から購入した。4-カルボキシフェニルボロン酸(4CPBA)、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸溶液(TNBS, 5% (w/v) in H₂O)、 α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸(α -CHCA)、シグマアルドリッチジャパン合同会社(東京)から購入した。レペタン[®]注 0.2 mg は、大塚製薬株式会社(東京)から購入した。ヘパリンは、ヘパリン Na 注 5000 単位/5 mL「モチダ」を用い、持田製薬工場株式会社(栃木)から購入した。血液は緬羊赤血球保存血液をコージンバイオ株式会社(埼玉)から購入した。その他の試薬に関しては、第1章と同様である。

2. 使用機器

持効型製剤、ヒトインスリンまたは PBA-Ins の会合状態(立体構造)の測定には、円二色性分散計(J720WI spectrometer, 日本分光株式会社、東京)を使用した。血糖値の測定には、マイクロプレートリーダー(SpectraMaxM5[®] multiplate reader, Molecular Device, カルフォルニア、アメリカ)を使用した。凍結乾燥には、真空凍結乾燥機(LABCONCO, 朝日ライフサイエンス株式会社、埼玉)を使用した。PBA-Ins の合成確認には、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析装置(MALDI TOF-MS, JMS-S3000, 日本電子、東京)を使用した。ThT 染色後の ThT 蛍光の確認は、ハンディ UV ランプ(SLUV-4, アズワン株式会社、大阪)を使用した。その他の機器に関しては、第1章と同様である。

3. 実験動物

3-1. *In vivo* での線維化実験

Wistar 系雄性ラット(120-150 g, 5 週齢)を三共ラボサービス株式会社(東京)から購入し、1 週間検疫および馴化させた。自由に食餌および水を摂取できるようにした。麻酔はすべて、特

に特記がない限り、イソフルランの吸入麻酔(導入;5%, 0.2 L/min、維持;2%, 0.2 L/min)で実施した。なお、本節におけるラットを用いた実験は、城西大学動物実験規定に従い、全学動物実験管理委員会の承認(承認番号:H29047 号、JU18041 号、JU19021 号)を得てから実施した。

3-2. 血糖降下作用の確認実験

Wistar 系雄性ラット(160-180 g, 6 週齢)を三共ラボサービス株式会社から購入し、1 週間検疫および馴化させた。自由に食餌および水を摂取できるようにし、血糖降下作用の確認実験の実験開始 20-24 時間前から自由飲水下で絶食させた。麻酔は第 2 章 3-1. と同様である。なお、本節におけるラットを用いた実験は、城西大学動物実験規定に従い、全学動物実験管理委員会の承認(承認番号:H28036 号、H29043 号、JU18104 号、JU19108 号)を得てから実施した。

4. PBS (pH 7.4, pH 4.0) の調製

pH 7.4 については、第 1 章の 3. と同様である。pH 4.0 については、Table S7 に示した組成の水溶液 A および B を pH 4.0 になるように混合した。

Table S7 Composition of PBS (pH 4.0).

	reagent	concentration
solution A	sodium chloride (NaCl)	137 mM
	potassium chloride (KCl)	2.68 mM
	sodium dihydrogen phosphate (NaH ₂ PO ₄)	10 mM
solution B	sodium chloride (NaCl)	137 mM
	potassium chloride (KCl)	2.68 mM
	phosphate acid (H ₃ PO ₄)	10 mM

5. リン酸塩緩衝液の調製

リン酸塩緩衝液(50 mM, pH 7.4)については、第 1 章の 4. と同様である。リン酸塩緩衝液(10 mM, pH 8.9)については、リン酸水素二ナトリウム(10 mM)を蒸留水で溶解し、HCl(1 M)で pH 8.9 に調整した。

6. レベミル®の繰り返し投与による *in vivo* での線維化

1 週間馴化させ、6 週齢になったラットを、レベミル®原液(120 nmol/50 μ L/body)を 1 日 1 回 3 週間投与する群と PBS(pH 7.4, 50 μ L/body)を 1 日 1 回 2 週間投与する群の 2 群に分け、イソフルラン麻酔下でラットの背部左右に毎日皮下投与した。レベミル®投与群は、低血糖防止のために、併せてスクロース(50%水溶液を 0.5 mL/kg, 250 mg/kg)を腹腔内に投与した。

所定の期間後、イソフルラン麻酔下でラットの大動脈を切断し、脱血した。背部の皮膚を切り、投与部位を摘出した。摘出後、投与部位を撮影し、生理食塩液で調製した ThT (100 μ M) に一晚浸漬した後、暗所で 365 nm の蛍光を照射した状態で再度撮影した。浸漬中に ThT が組織内に浸透しやすいように、浸漬前の写真を撮影後、組織に注射針 (27G) を数十回貫通させた。浸漬後は、ピンセットを用いて、投与部位の組織を裂き、ThT 蛍光応答の有無を確認した。これらの処置は PBS 投与部位においても、同様に行った。

7. 持効型製剤の線維化の比較

7-1. 持効型製剤の線維化試験

各種持効型製剤を用いて、第 1 章の 5. と同様の操作で 850 rpm で攪拌を行い、ヒューマリン[®]R、ランタス[®]、レベミル[®]は 72 時間まで、トレシーバ[®]は 336 時間までの所定の時間に ThT 蛍光測定 (第 1 章の 11.) を行った。

ヒューマリン[®]R、ランタス[®]、レベミル[®]は 72 時間におけるバイアル中での析出物の、トレシーバ[®]は 336 時間における析出物のラマン散乱を測定した。それぞれの析出物は、バイアル中の懸濁溶液全量を遠心 (21500 \times g、5 分、4 \square) し、上清を除いた後、ヒューマリン[®]R、レベミル[®]、トレシーバ[®]は PBS (pH 7.4) で、ランタス[®] は PBS (pH 4.0) で、同様の条件で 2 回遠心洗浄を行い、固体を得た。得られた析出物の固体をスパーテルで少量取り、ガラスカバー上に乗せ、60 倍の対物レンズを用いて、532 nm のレーザーを照射し、50 回/秒でラマン散乱を測定した。

7-2. 持効型製剤の凍結乾燥品のラマン分光測定による立体構造の解析

各種持効型製剤をプラスチック製の遠沈管に入れ、-20 \square のフリーザーで凍結後、凍結乾燥した。得られた粉体をスパーテルで少量取り、ガラスカバー上に乗せ、第 2 章 7-1. と同様の条件で、ラマン散乱を測定した。

7-3. 円二色性測定による製剤中のインスリン誘導体の立体構造解析

各種製剤原液を希釈せずに測定した。溶媒に由来するピークが 190-220 nm 付近に現れるため、240-300 nm での最適測定値に合わせて 190-300 nm を測定すると、190-220 nm でのノイズ増大により値が得られなかった。また、190-260 nm での最適測定値に合わせて 190-300 nm を測定すると、240-300 nm でピークがほとんど現れなかったため、190-260 nm と 240-300 nm で、層長の異なるキュベットを用いて、Table S8 に示す条件で測定した。

Table S8 Measurement conditions of circular dichroism for formulations.

sensitivity	standard (100 mdeg)
measurement range	190-260 nm (pathlength 0.01 mm)
& pathlength	240-300 nm (pathlength 0.5 mm)
data acquisition interval	0.025 nm
scan mode	continuous
scan speed	20 nm / min
response	16 sec
bandwidth	1.0 nm
number of integrations	5

8. 添加剤を除いたインスリンデグルデクの線維形成実験

8-1. トレシーバ®の脱添加剤処理

トレシーバ®原液を、透析膜(スペクトラ/ポア RC 透析用チューブ 再生セルロース製 MWCO 3500, SPECTRUM LABORATORIES, カルフォルニア, アメリカ)に入れ、外液を HCl (1 M) で pH 3.0 に調整したエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA・2Na, 0.1%)水溶液にし、低温室で透析した。外液を EDTA・2Na (0.1%, pH 3)にして 6 回交換した後、外液を蒸留水に替えて、さらに 6 回交換した。透析膜内の溶液を-20℃のフリーザーで凍結後、凍結乾燥し、インスリンデグルデクの固体を得た。

8-2. 添加剤を除いたインスリンデグルデクの線維形成実験

第 2 章 8-1. で添加剤を除いたインスリンデグルデク(3.55 mg)をバイアル(6 mL)に入れ、PBS(pH 7.4, 5 mL)を加えた(120 µM)。対照として、トレシーバ® の製剤原液(600 µM)を PBS (pH 7.4)で 5 倍希釈し(120 µM)、バイアル(6 mL)に 5 mL 入れた。その後、第 1 章の 5. と同様の操作で 850 rpm で攪拌し、両者の線維化を比較した。

8-3. インスリンデグルデクの円二色性測定による立体構造解析

測定に用いたキュベット(Table S9)以外は、第 2 章の 7-3. と同様である。

Table S9 Measurement conditions of circular dichroism for

diluted with Tresiba® (120 µM) and insulin deguldec (120 µM).

measurement range	190-260 nm (pathlength 0.2 mm)
& pathlength	240-300 nm (pathlength 2.0 mm)

9. 異種核存在下での持効型インスリンの線維化

9-1. *In vitro* での線維化

第 1 章の 6. と同様であるが、調製したヒトインスリン線維溶液(核)を添加する溶液は各種持効型製剤をリン酸塩緩衝液(50 mM, pH 7.4)で 5 倍希釈した溶液である。

9-2. *In vivo* での線維化

9-2-1. 線維化ヒトインスリン粉末の調製

クリーンベンチ内で、ヒューマリン®R 注バイアル全量(10 mL)を、オートクレーブで滅菌したバイアル(20 mL)に入れた。これを、24 本作製し、50℃、250 rpm で 72 時間巡回振盪した。その後、24 本を一括にまとめて、マクロセップ アドバンス遠心ろ過デバイス オメガメンブレン 100 K(日本ポール株式会社、東京)に均等に分注し、10000×g、30 分で遠心して、ろ液を除いた。洗浄のため、蒸留水(10 mL)を入れ、10000×g、15 分で遠心し、ろ液を除いた。これを 2 回行った後、-20℃のフリーザーで凍結させ、凍結乾燥機に入れて、線維化ヒトインスリンの粉末を得た。

9-2-2. 投与スケジュールおよび投与量

第 2 章 9-1-1. で調製した線維化ヒトインスリン粉末(5 mg)を PBS(pH 7.4, 1 mL)で調製し、超音波をかけながら懸濁させ、これを核とした。1 週間馴化させ、6 週齢になったラットの背部を、イソフルラン吸入麻酔下でバリカンを用いて剃毛し、背部左右の皮膚に直径約 1.5 cm の円を刺青した。ラットの背部左右の円に、調製した線維化ヒトインスリン粉末懸濁溶液(5 mg/mL)を皮下投与(500 µg/100 µL)した(1 日目)。その後、2 週間、1 日 1 回、イソフルラン吸入麻酔下で、各種持効型製剤原液もしくは PBS(pH 7.4)を皮下投与(50 µL)した。低血糖回避のために、製剤を投与する群は、併せてスクロース水溶液(50%aq を 0.5 mL/kg, 250 mg/kg)を腹腔内投与した。刺青は基本的に 1 日目のみ行い、剃毛は必要に応じて行った。

9-2-3. 投与部位の ThT 染色

第 2 章 9-2-2. のスケジュールで線維化ヒトインスリン粉末懸濁溶液と、各種持効型製剤原液もしくは PBS(pH 7.4)を投与したラットを、第 2 章 6. と同様の操作で投与部位を ThT で染色し、投与部位の ThT 蛍光応答の有無を確認した。

10. PBA-Ins の合成

10-1. PBA-Ins の合成

4CPBA を以下の操作で活性化した。ジメチルホルムアミド(超脱水, 12 mL)とトリブチルアミン(61.2 µL)をスクリー管(20 mL)に入れ、攪拌した。そこに、4CPBA(43 mg, 0.26 mmol)を加え、溶解させたのち、クロロギ酸イソブチル(33 µL)を加えて 30 分間反応させた(反応液 1)。ジメチルスルホキシド(超脱水, 60 mL)とトリブチルアミン(300 µL)をナスフラスコ(100 mL)に入れ、攪

拌した。そこに、ヒトインスリン(300 mg, 0.052 mmol)を加え、溶解した後、反応液 1 を全量滴下し、窒素雰囲気下で 3 時間、室温で反応させた。その後、氷冷下で、蒸留水(10 mL)を加え、反応を止めた(反応液 2)。

反応終了後、透析により精製を行った。反応液 2 を、透析膜(スペクトラ/ポア RC 透析用チューブ 再生セルロース製, MWCO 3500)に入れ、外液を、炭酸水素アンモニウム(0.1%)水溶液にし、低温室で透析した。外液を炭酸水素アンモニウム(0.1%)で 6 回交換した後、外液を蒸留水に替えて、さらに 6 回交換した。透析膜内の溶液を-20℃のフリーザーで凍結した後、凍結乾燥し、PBA-Ins の固体を得た。

10-2. PBA-Ins の MALDI TOF-MS

合成の確認には、MALDI TOF-MS を用いた。キャリブレーションは、ヒトインスリンで行った。TFA(0.1%)含有 50%アセトニトリル水溶液で調製したヒトインスリン(1 mg/mL)または PBA-Ins(1 mg/mL)を 10 µL 取り、TFA(0.1%)含有 50%アセトニトリル水溶液で調製した α -CHCA (10 mg/mL, 10 µL)と混合し、0.5 µL を測定プレートに播種し、Table S10 に示した条件で測定した。

Table S10 Measurement conditions of MALDI TOF-MS for PBA-Ins.

mode	Linear:POS
delay time	1000 ns
detector	-1740 V

11. PBA-Ins の PBA 修飾数の評価

リン酸塩緩衝液(0.01 M, pH 8.9)で SDS 溶液(0.15%)を調製した(溶液①)。溶液①でヒトインスリン(1.0 mg/mL)と PBA-Ins(1.0 mg/mL)のサンプル溶液を調製した。試薬の TNBS(5%)を溶液①で希釈し、0.03%に調製した(②)。バイアルに各サンプル溶液(2.0 mL)を入れ、そこに溶液②(2.0 mL)および溶液③(1.0 mL)を加えて、50℃で 1 時間振とう混和した。その後、塩酸(0.2 M, 3.8 mL)をバイアルに加え、室温で 30 分間静置し、Table S11 に示す条件で吸収スペクトルを測定して、吸収極大波長における吸光度を求めた。

Table S11 Measurement conditions for calculating the number of modified PBA in PBA-Ins.

measurement mode	wavelength scan
measurement range	200-600 nm
initial wait time	20 sec
slit	4 nm
high resolution measurement	off
scan speed	300 nm/min
light source switching	Auto (350 nm)
photomultiplier voltage mode	Auto
sampling interval	Auto
measurement temperature	37℃

12. PBA-Ins の血糖降下作用の評価

12-1. 外科的処置

血糖降下作用に及ぼす麻酔の影響を排除するために、ラットに外科的処置を行い、無麻酔下で血糖降下作用を評価した。イソフルラン麻酔下で、頸静脈から心臓部まで挿入したカニューレの先端を後頸部から突き出し、そこから薬物投与と血液採取ができるようにした。外科的処置直後に、鎮痛剤として生理食塩液で調製したレペタン(0.02 mg/mL)を腹腔内投与(1 mL/kg)し、4-7 日間を回復期とした。

12-2. ストレプトゾシン誘発糖尿病ラットの作製

外科的処置後、カニューレから生理食塩液で調製したストレプトゾシン(50 mg/mL)を静脈内投与(1 mL/kg)した。血糖降下作用の評価を行う当日の薬物投与直前の空腹時血糖値が 250 mg/dL 以上のラットを糖尿病ラットとして実験に用いた。

12-3. 投与量および投与方法

12-3-1. 静脈内投与および皮下投与

薬物投与開始 20-24 時間前から絶食し、投与実験の開始 30 分前にボールマンケージに拘束した。投与実験中は自由に飲水させた。拘束後、PBS (pH 7.4) で調製したヒトインスリン(190 µg/mL)または PBA-Ins(190 µg/mL)を静脈内投与の場合はカニューレから、皮下投与の場合はボールマンケージの隙間から背中中の皮膚をつまみ、投与(1mL/kg)した。

12-3-2. 静脈内および皮下投与後のグルコース負荷試験

第 2 章 12-3-1. と同様の操作でヒトインスリンまたは PBA-Ins を投与後、2.7 時間経過した際に、ボールマンケージからラットを出し、2.75 時間経過後に蒸留水で溶解したグルコース(0.5 g/mL)を、腹腔内に投与(2 mL/kg)した。その後、速やかに再びボールマンケージに拘束し、所定の時間に血液を採取した。

12-4. 血液の採取方法

ヘパリン処理した注射筒を用いて、ヒトインスリンまたは PBA-Ins の投与前および投与後 8 時間までの所定の時間に、カニューレから血液(100 μ L)採取した。採取後、体液量を一定に保つために、生理食塩液(100 μ L)をカニューレから投与し、生理食塩液で 10 倍に希釈したヘパリン(30 μ L)をカニューレに注入した。

12-5. 血漿の採取方法

得られた血液を遠心分離(2000 \times g, 4 \square , 2 分)して血漿を得た。

12-6. 血糖値の測定

グルコースキット グルコース C \square -テストワコーを用いて、血漿(20 μ L)のグルコース濃度を測定した。測定操作はグルコースキット グルコース C \square -テストワコーのプロトコールに従った。

13. PBA-Ins の線維化試験

ヒトインスリン(3.48 mg)または PBA-Ins(3.66 mg)を、バイアル(6 mL)に入れ、PBS(pH 7.4, 5 mL)で溶解後(120 μ M)、850 rpm での攪拌し、第 1 章の 11. と同様の操作で所定の時間に ThT 蛍光測定を行った。

14. PBA-Ins と赤血球凝集試験

血液は緬羊赤血球保存血液を用いた。この血液をマイクロチューブ(10 μ L)に入れ、NaCl(154 mM)含有 HEPES 緩衝液(200 mM)で全量が 1 mL になるように 200 倍に希釈した。200 倍希釈した赤血球懸濁液を 96 ウェル UV マイクロプレート(最大容量 392 μ L, U 底, 128 \times 86 mm Thermo)の A, B, C 行の 1, 2, 3 列目に 50 μ L 加えた。さらに、A 行には NaCl(154 mM)含有 HEPES 緩衝液(200 mM)、B 行には NaCl(154 mM)含有 HEPES 緩衝液(200 mM)で調製したヒトインスリン(1.30 mg/mL, 170 μ M)溶液、C 行には NaCl(154 mM)含有 HEPES 緩衝液(200 mM)で調製した PBA-Ins(1.40 mg/mL, 170 μ M)溶液をそれぞれ 150 μ L 加え、全量を 200 μ L とした。最終赤血球希釈倍率はどの条件においても 800 倍とした。これらを 12 時間静置し、ウェルを上から撮影するとともに、顕微鏡で観察した。

15. PBA-Ins の PBA 修飾部位の特定

15-1. トリプシン分解

炭酸水素アンモニウム水溶液(50 mM)でヒトインスリン(1 mg/500 μ L)または PBA-Ins(1 mg/500 μ L)を溶解後、80 μ L をトリプシン(0.1 mg/mL, 40 μ L)と混合し、37 \square のインキュベーター内で 4 時間放置した。そのうちの 20 μ L を TFA 水溶液(2.5%, 2 μ L)と混合後、10 μ L を TFA(0.1%)含有 50%アセトリル水溶液で溶解させた α -CHCA(10 mg/mL, 10 μ L)と混合し、0.5 μ L をプレートに播種し、MALDI TOF-MS を用いて Table S12 に示す条件で測定した。

キャリブレーションは、ポリエチレングリコール 1000 および 4000 で行った。蒸留水で調製したポリエチレングリコール 1000 (10 mg/mL, 0.5 μ L) および 4000 (10 mg/mL, 0.5 μ L) を上述の α -CHCA 溶液 (10 μ L)、メタノールで調製したヨウ化ナトリウム (1 mg/mL, 1 μ L) と混合し、0.5 μ L をプレートに播種した。

Table S12 Measurement conditions of MALDI TOF-MS for trypsin digestion.

mode	Linear:POS
delay time	500 ns
detector	-1740 V

15-2. 還元アルキル化

炭酸水素アンモニウム水溶液 (50 mM) でヒトインスリン (1 mg/500 μ L) または PBA-Ins (1 mg/500 μ L) を溶解後、25 μ L を炭酸水素アンモニウム水溶液 (50 mM, 75 μ L) と混合し、4 倍に希釈した。そのうちの 25.5 μ L を、蒸留水で調製したジチオトレイトール (7.7 mg/100 μ L, 1.5 μ L) と混合し、95℃で 5 分間反応させた。その後、室温まで冷却し、蒸留水で調製したヨードアセトアミド (9.98 mg/100 μ L, 3 μ L) を加え、室温で 20 分間反応させた後、10 μ L を TFA (0.1%) 含有 50% アセトニトリル水溶液で溶解させた α -CHCA (10 mg/mL, 10 μ L) と混合し、0.5 μ L をプレートに播種し、MALDI TOF-MS を用いて Table S13 に示す条件で測定した。

キャリブレーションは、ポリエチレングリコール 4000 で行った。蒸留水で調製したポリエチレングリコール 4000 (10 mg/mL, 1 μ L) を上述の α -CHCA 溶液 (10 μ L)、メタノールで調製したヨウ化ナトリウム (1 mg/mL, 1 μ L) と混合し、0.5 μ L をプレートに播種した。

Table S13 Measurement conditions of MALDI TOF-MS for the reductive alkylation.

mode	spiral
delay time	270 ns
detector	-1500 V

16. PBA-Ins の長期保存時の線維化試験

第 2 章 13. と同様の操作で長時間実験を行った。

17. PBA-Ins の立体構造の評価

ヒトインスリン (3.48 mg) または PBA-Ins (3.66 mg) を、バイアル (6 mL) に入れ、PBS (pH 7.4, 5 mL) で溶解させた (120 μ M)。測定に用いたキュベットは第 2 章 8-3. Table S9 と同様で、そのほかの条件は第 2 章 7-3. Table S8 と同様である。

18. PBA-Ins の亜鉛イオン含有量の評価

ヒトインスリン (5 mg) または PBA-Ins (5 mg) をメスフラスコ (20 mL) に入れ、アンモニア水 (10%) でメスアップし、亜鉛イオン濃度を第 1 章 13. Table S6 に示した条件で原子吸光光度計を用いて測定した。

19. 統計処理

第 1 章 14. と同様である。

第3章 実験の部

1. 実験材料

FITC-Dextran(FD-10)は、平均分子量 10000 のものを用い、シグマアルドリッチジャパン合同会社(東京)から購入した。エバンスブルー(化学用)は、富士フイルム和光純薬株式会社(大阪)から購入した。ゲンタシン[®]軟膏 0.1%は、高田製薬株式会社(埼玉)から購入した。エムラ[®]クリームは、佐藤製薬株式会社(東京)から購入した。透過実験には、セルロースアセテートタイプメンブレンフィルター(孔径 0.2 μm)の膜を用い、アドバンテック東洋株式会社(東京)から購入した。Mercodia Ultrasensitive Insulin ELISA は、Mercodia(スウェーデン)から購入した。Pierce[™] BCA Protein Assay kit は、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社(東京)から購入した。その他の試薬に関しては、第1章および第2章と同様である。

2. 使用機器

ラットの刺青には、小実験動物用 Tattoo(刺青)システム(株式会社ハクバテック・ライフサイエンス・ソリューションズ、東京)を使用した。血流量の測定には、非接触型レーザードップラー血流画像化装置 PeriCcan PIM[□][®](PRIMED Ltd, スウェーデン)を使用した。プレートシェーカーは、MS3 dital(IKA[®] Japan K.K., 大阪)を使用した。その他の機器に関しては、第1章および第2章と同様である。

3. 実験動物

Wistar 系雄性ラット(120-150 g, 5 週齢)を三共ラボサービス株式会社から購入し、1 週間検疫および馴化させた。自由に食餌および水を摂取できるようにし、吸収実験(第3章 10.)に使用するラットのみ、実験開始 24 時間前から自由飲水下で絶食させた。麻酔はすべて、特に特記がない限り、イソフルランの吸入麻酔(導入;5%, 0.2 L/min、維持;2%, 0.2 L/min)で実施した。なお、本章におけるラットを用いたすべての実験は、城西大学動物実験規定に従い、全学動物実験管理委員会の承認(承認番号:H29047 号、JU18041 号、JU19021 号)を得てから実施した。

4. PBS(pH 7.4)の調製

第1章の3. と同様の方法で調製した。

5. 線維化ヒトインスリン懸濁液の調製

バイアル(6 mL)にヒューマリン[®]R 原液(5 mL)と直径 5 mm のジルコニアボールを入れ、50[□]のインキュベーター内で 250 rpm で 24-72 時間旋回振盪した。経時的に濁度測定と ThT 蛍光測定を行い、濁度が 0.3-0.4、蛍光強度が 140-180 の線維化ヒトインスリン懸濁液を投与液とした。なお、線

維化したもの(析出物)とそうでないもの(溶解物)の分離は行っていない。濁度測定および蛍光測定は第 1 章の 10. 11. と同様の方法で実施した。

6. ラットへの線維化ヒトインスリン懸濁液の投与方法

イソフルラン吸入麻酔下で、ラットの背部をバリカンで剃毛後、背部左右の皮膚に、直径約 1.5 cm の円を刺青した。ラットの背部左側の円には PBS (pH 7.4, 50 μ L/body) を、背部右側の円には線維化ヒトインスリン懸濁液(総ヒトインスリン含量 30 nmol/50 μ L/body) を、イソフルラン吸入麻酔下で、2 週間、1 日 1 回皮下投与した。背部の左右に別の試料を投与することで、ラットの使用匹数を減少できた。低血糖回避のために、併せてスクロース水溶液 (50%aq を 0.5 mL/kg, 250 mg/kg) を腹腔内投与した。刺青は基本的に 1 日目のみ行い、剃毛は必要に応じて行った。

7. 線維化ヒトインスリンの皮下での存在確認

7-1. 投与部位の血管透過性の評価

第 3 章の 6. に記載の方法で線維化ヒトインスリン懸濁液または PBS を投与した。初回投与の 14 日後、イソフルラン吸入麻酔下で、ラットの頸静脈を露出させ、頸静脈から生理食塩液で調製したエバンスブルー (2%, 50 μ L/body) を静脈内投与した。その後、開いた部位を縫合し、患部に抗生剤としてゲンタシン[®]軟膏 0.1% と局所麻酔剤としてエムラ[®]クリームを塗布し、エバンスブルー投与 24 時間経過後に、イソフルラン麻酔下で大動脈切断により脱血し、線維化ヒトインスリン懸濁液および PBS 投与部位を開き、エバンスブルーの漏出を観察した。

7-2. 投与部位の ThT 染色

第 3 章の 6. に記載の方法で線維化ヒトインスリン懸濁液または PBS を投与した。初回投与の 17 日後、第 2 章の 6. と同様の方法で試料を調製し、観察した。

7-3. 投与部位のラマン分光測定

第 3 章の 6. に記載の方法で線維化ヒトインスリン懸濁液または PBS を投与した。初回投与の 17 日後、イソフルラン麻酔下で第 3 章の 7-1. と同様の方法で脱血後、背部の皮膚を切り、線維化ヒトインスリン懸濁液投与部位に見られた塊のみを組織から摘出した。摘出物を、ピンセットで可能な限り薄く延ばして、ガラスカバーにのせ、第 2 章の 7. と同様の方法でラマン分光測定を行った。

8. 皮下投与した背部の目視での観察

第 3 章の 6. に記載の方法で線維化ヒトインスリン懸濁液または PBS を投与し、イソフルラン麻酔下で、初回投与の 17 日後の皮膚状態を観察し、背部を撮影した。

9. 線維化ヒトインスリン懸濁液投与部位の血流量の評価

第3章の8.に記載のラットについて、イソフルラン吸入麻酔下で、非接触型レーザードップラー血流画像化装置を用いて血流量を測定し、円の部分の血流量を定量した。

10. ラットを用いたヒューマリン®RとFD-10の吸収実験

第3章の8および9.に用いたラットを引き続き皮下投与実験に用いた。

10-1. 投与スケジュールおよび投与方法

PBS (pH 7.4)と線維化ヒトインスリン懸濁液を2週間投与後、線維化ヒトインスリン懸濁液中のヒトインスリンの影響を排除するために、2日間飼育した(15-16日目)。吸収実験開始の24時間前(16日目)から自由飲水下で絶食させ、17日目に、吸収実験を行った。ラットを2群に分け、イソフルラン吸入麻酔下で、頸静脈を露出後、背部左右にそれぞれヒューマリン®R (12 nmol/kg)とFD-10 (16.5 mg/kg)を皮下投与した(Table S14)。投与容量は、投与液の皮下投与後の拡散性を、2週間、PBSと線維化ヒトインスリン懸濁液を投与した際とおおよそ同じ50 µL程度になるように投与液を調製した。ヒューマリン®Rは製剤をPBS (pH 7.4)で希釈し、FD-10は生理食塩液で溶解させ、それぞれの溶液を調製した。

Table S14 Grouping of Humulin®R and FD-10 absorption experiments.

	PBS injection site	Fibril human insulin injection site
	Humulin®R	FD-10
Group A		
Group B	FD-10	Humulin®R

10-2. 血液の採取方法

ヘパリン処理した注射筒と注射針(27G)を用いて、投与前および投与後6時間までの所定の時間に、頸静脈から血液(200 µL)を採取した。採取後、体液量を一定に保つために、生理食塩液(200 µL)を頸静脈から投与した。

10-3. 血漿の採取方法

得られた血液を遠心分離(2000×g, 4℃, 2分)して血漿を得た。

10-4. 血漿中ヒトインスリンの定量

得られた血漿を、Table S15に示した希釈倍率でPBS (pH 7.4)を用いて希釈し、Mercodia Ultrasensitive Insulin ELISAを用いて定量した。ヒトインスリンの時間曲線下面積(AUC_{0-6 hr})は台形公式を用いて算出した。

Table S15 Sample preparation for quantifying insulin in plasma.

Time	Dilution ratio	Plasma sample	PBS
0 hr	5	20 μ L	80 μ L
0.25-1 hr	200	10 μ L	1990 μ L
2-6 hr	100	10 μ L	990 μ L

ELISA の手順は以下の通りである。マイクロプレート、試薬、血漿サンプルを室温に戻した後、ウェルに Calibrator と血漿サンプル (25 μ L) を入れ、enzyme conjugate 1 \times (100 μ L) を加えた。25 \square のインキュベーター内で、プレートシェーカーを用いて、800 rpm で 1 時間攪拌した。攪拌後、ディスペンサーを用いて固相をチップで傷つけないように注意しながら、ウェルから溶液を取り除き、他のウェルと混ざらないように注意しながら、wash buffer 1 \times (200 μ L) を入れた。それを除去し、同様に 2 回行った後、洗瓶に入れた wash buffer 1 \times をウェルからあふれるようにマイクロプレート全体にかけ、マイクロプレートを反転させ、wash buffer を除いた。これを 5 回繰り返した後、ペーパータオル上でマイクロプレートを反転させたまま軽くたたき、wash buffer を除き、ウェルに Substance TMB (200 μ L) を加えた。25 \square のインキュベーター内で 30 分間静置後、Stop solution (50 μ L) を加えて、30 秒間 500 rpm で混合後、マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。

10-5. 血漿中 FD-10 の定量

得られた血漿 (10 μ L) を PBS (pH 7.4) で 100 倍希釈し、蛍光分光光度計にて Table S16 に示す条件で、セル長 2 mm のキュベットを用いて定量した。FD-10 の時間曲線下面積 (AUC_{0-6hr}) は台形公式から算出した。検量線は、投与液を PBS (pH 7.4) で希釈し、作製した。

Table S16 Measurement conditions for FD-10 fluorescence measurement.

excitation wavelength	492 nm
emission wavelength	515 nm
measurement mode	quantitative measurement
scan speed	Fast
bandwidth	excitation 5 nm emission 5 nm
detection range	High
measurement temperature	room temperature

11. 透過実験

11-1 実験装置の組み立て

第 2 章 9-2-1. に記載の線維化ヒトインスリン粉末をでんぷん粉末で希釈して、横型拡散セルのセル間に、セルロースアセテート製のメンブレンフィルター (孔径 0.2 μ m) 2 枚で挟んで設置した。線維化ヒトインスリン粉末含有でんぷん粉末は、線維化ヒトインスリン粉末をでんぷん粉

末に 10%含有させたものと 20%含有させたものを、メノウ乳鉢で混合調製し、メンブレンフィルターに 2 mg 挟んだ。メンブレンフィルターに挟んだ線維化ヒトインスリン粉末中に残存している未変化体のヒトインスリンの影響を排除するために、はじめに両セルに PBS (pH 7.4, 3.5 mL) を入れ、12 時間経過後に全量を交換し、24 時間経過後に全量を取り除いたうえで、一方のセル(ドナー側)には PBS (pH 7.4) で調製したヒトインスリン (2 mg/mL) と FD-10 (2 mg/mL) を含有する水溶液を 3.5 mL 入れ、もう一方のセル(レシーバー側)には、PBS (pH 7.4) を 3.5 mL 入れた。

11-2. ヒトインスリンの定量

レシーバー側に透過してきたヒトインスリンを、PierceTM BCA Protein Assay kit (Thermo SCIENTIFIC) を用いて、タンパク質の濃度として定量した。

BCA タンパク定量の手順は以下の通りである。BCA Reagent A と BCA Reagent B を 50:1 で混合し、working reagent を調製後、96 ウェルマイクロプレートに 200 μ L 入れた。そこに、透過サンプル (10 μ L) を加え、ピペッティングにより混合した。その後、37 $^{\circ}$ C のインキュベーター内で 30 分間静置し、室温に戻した後、マイクロプレートリーダーを用いて、562 nm の吸光度を測定した。検量線は、キット内のアルブミンを PBS (pH 7.4) で希釈し、作製した。

11-3. FD-10 の定量

レシーバー側に透過してきた FD-10 を、ブラックマイクロプレート (200 μ L) に入れ、マイクロプレートリーダーを用いて、励起波長 494 nm で蛍光波長 515 nm の蛍光強度を測定した。検量線は、11-1 で調製したセルに適用した溶液を PBS (pH 7.4) で希釈し、作製した。

12. 統計処理

第 1 章 14. と同様である。

参考文献

1. International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th Edition. 2019.
2. 国民健康・栄養調査. 厚生労働省. 2016.
3. 荒木 栄一. インスリン製剤の使い分け 成人病と生活習慣病. 2008;38:451-7.
4. 荒木 栄一. ヴィジュアル 糖尿病臨床のすべて 最新インスリン療法 改訂第2版. 株式会社 中山書店. 2015.
5. 加来 浩平. 糖尿病治療のニューパラダイム 第3巻 薬物治療の実践~インスリンを中心に~ 初版. 株式会社 医薬ジャーナル社. 2015.
6. Albert SG, Obadiah J, Parseghian SA, Yadira Hurley M, Mooradian AD. Severe insulin resistance associated with subcutaneous amyloid deposition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;75:374-6.
7. Lonsdale-Eccles AA, Gonda P, Gilbertson JA, Haworth AE. Localized cutaneous amyloid at an insulin injection site. *Clin Exp Dermatol.* 2009;34:e1027-8.
8. Nagase T, Katsura Y, Iwaki Y, Nemoto K, Sekine H, Miwa K, et al. The insulin ball. *Lancet.* 2009;373:184.
9. Yumlu S, Barany R, Eriksson M, Röcken C. Localized insulin-derived amyloidosis in patients with diabetes mellitus: A case report. *Hum Pathol.* 2009;40:1655-60.
10. Sie MPS, van der Wiel HE, Smedts FMM, de Boer AC. Human recombinant insulin and amyloidosis: An unexpected association. *Neth J Med.* 2010;68:138-40.
11. Shikama Y, Kitazawa J, Yagihashi N, Uehara O, Murata Y, Yajima N, et al. Localized amyloidosis at the site of repeated insulin injection in a diabetic patient. *Intern Med.* 2010;49:397-401.
12. 吉寄 友之, 本田 宗宏. インスリン吸収に及ぼす影響を検討しえた皮下局所的アミロイド沈着の1例. 糖尿病. 2012;55:786-92.

13. Okamura S, Hayashino Y, Kore-Eda S, Tsujii S. Localized amyloidosis at the site of repeated insulin injection in a patient with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2013;36:e200.
14. Souza AD, Theis JD, Vrana JA, Dogan A. Pharmaceutical amyloidosis associated with subcutaneous insulin and enfuvirtide administration. *Amyloid*. 2014;21:71-5.
15. Nagase T, Iwaya K, Iwaki Y, Kotake F, Uchida R, Oh-I T, et al. Insulin-derived amyloidosis and poor glycemic control: A case series. *Am J Med*. 2014;127:450-4.
16. 矢部 沙織, 高橋 博之, 後藤田 裕子, 森 孝之, 井川 裕之, 工藤 ひとみ, et al. インスリン注射部位におけるインスリン由来アミロイド-シスにより著しい血糖コントロール悪化を認めた 1 例. *糖尿病*. 2015;58:34-40.
17. 山城 慶子, 高橋 千春, 上村 志津子, 飯田 直子, 横田 純子, 稲垣 賀子, et al. インスリン注射による皮下腫瘍の検出とサイトロ-テーション指導の重要性. *糖尿病*. 2015;58:439-45.
18. 楠 和久, 吉寄 友之, 竹田 朋子, 本田 宗宏. インスリン注射による皮下腫瘍の病理組織, 画像所見およびインスリン吸収についての検討. *糖尿病*. 2015;58:388-97.
19. Bernárdez C, Schärer L, Molina-Ruiz AM, Requena L. Nodular amyloidosis at the sites of insulin injections. *J Cutan Pathol*. 2015;42:496-502.
20. Gupta Y, Singla G, Singla R. Insulin-derived amyloidosis. *Indian J Endocrinol Metab*. 2015;19:174-7.
21. Mangla A, Kim GJ, Agarwal N, Khurana S, Catchatourian R, Jiang JJ. Localized insulin amyloidosis with use of concentrated insulin: a potential complication. *Diabet Med*. 2016;33:e32-5.
22. Shiba M, Kitazawa T. Progressive insulin-derived amyloidosis in a patient with type 2 diabetes. *Case Reports Plast Surg Hand Surg*. 2016;3:73-6.

23. Ansari AM, Osmani L, Matsangos AE, Li QK. Current insight in the localized insulin-derived amyloidosis (LIDA): Clinico-pathological characteristics and differential diagnosis. *Pathol Res Pract*. 2017;123:1237–41.
24. 池田 修一. 別冊・医学のあゆみ アミロイドーシスの最新情報 第 1 版. 医歯薬出版株式会社. 2017.
25. 第 8 回 日本くすりと糖尿病学会学術集会. プログラム・抄録集. 2019.
26. Störkel S, Schneider HM, Müntefering H, Kashiwagi S. Iatrogenic, insulin-dependent, local amyloidosis. *Lab Invest*. 1983;48:108–11.
27. 公益社団法人 日本糖尿病協会 編 インスリン自己注射ガイド. 2016
28. Nilsson MR. Insulin amyloid at injection sites of patients with diabetes. *Amyloid*. 2016;23:139–47.
29. 松本 晃一. インスリン注射部位の皮膚病変(インスリンボール). *CDEJ News Letter*. 2016;25:8.
30. Chowdhury TA, Escudier V. Lesson of the week: Poor glycaemic control caused by insulin induced lipohypertrophy. *Br Med J*. 2003;327:383–4.
31. Fujikura J, Fujimoto M, Yasue S, Noguchi M, Masuzaki H, Hosoda K, et al. Insulin-induced lipohypertrophy: Report of a case with histopathology. *Endocr J*. 2005;52:623–8.
32. Overland J, Molyneaux L, Tewari S, Fatouros R, Melville P, Foote D, et al. Lipohypertrophy: does it matter in daily life? A study using a continuous glucose monitoring system. *Diabetes Obes Metab*. 2009;11:460–3.
33. Brange J, Kang S. Monomeric insulins and their experimental and clinical implications. *Diabetes Care*. 1990;13:923–54.
34. Blundell TL, Cutfield JF, Cutfield SM, Dodson EJ, Dodson GG, Hodgkin DC, Mercola DA, Vijayan M. Atomic positions in rhombohedral 2–zinc insulin crystals. *Nature*. 1971;231:506–11.

35. Pocker Y, Biswas SB. Self-association of insulin and the role of hydrophobic bonding: A thermodynamic model of insulin dimerization. *Biochemistry*. 1981;20:4354–61.
36. Nielsen L, Khurana R, Coats A, Frokjaer S, Brange J, Vyas S, Uversky VN, Fink AL. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: Elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry* 2001;40:6036–46.
37. Hua QX, Weiss MA. Comparative 2D NMR studies of human insulin and des-pentapeptide insulin: sequential resonance assignment and implications for protein dynamics and receptor recognition. *Biochemistry* 1991;30:5505–15.
38. Birnbaum DT, Kilcombs MA, Defelippis MR, Beals JM. Assembly and dissociation of human insulin and LysB28ProB29-insulin hexamers a comparison study. *Pharm Res*. 1997;14:25–36.
39. Pettis RJ, Randolph TW, Carpenter JF, Teska BM, On JA. Effects of phenol and meta-cresol depletion on insulin analog stability at physiological temperature. *J Pharm Sci*. 2014;103:2255–67.
40. Wollmer A, Rannefeld B, Johansen BR, Hejnaes KR, Balschmidt P, Hansen FB. Phenol-promoted structural transformation of insulin in solution. *Biol Chem*. 1987;368:903–11.
41. Blader ML, Dunn MF. Insulin hexamers: New conformations and applications. *Trends Biochem Sci*. 1991;16:341–5.
42. Sipe JD, Cohen AS. Review: History of the amyloid fibril. *J Struct Biol*. 2000;130:88–98.
43. Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human Disease. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:333–66.
44. Ahmad A, Uversky VN, Hong D, Fink AL. Early in the fibrillation of monomeric insulin. *J Biol Chem*. 2005;280:42669–75.

45. Nielsen L, Frokjaer S, Brange J, Uversky VN, Fink a L, Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants. *Biochem.* 2001;40:8397–409.
46. Yang Y, Petkova A, Huang K, Xu B, Hua QX, Ye IJ, et al. An Achilles' heel in an amyloidogenic protein and its repair: Insulin fibrillation and therapeutic design. *J Biol Chem.* 2010;285:10806–21.
47. Selivanova OM, Galzitskaya OV. Structural polymorphism and possible pathways of amyloid fibril formation on the example of insulin protein. *Biochem.* 2012;77:1237–47.
48. Zako T, Sakono M, Hashimoto N, Ihara M, Maeda M. Bovine insulin filaments induced by reducing disulfide bonds show a different morphology, secondary structure, and cell toxicity from intact insulin amyloid fibrils. *Biophys J* 2009;96:3331–40.
49. Yoshihara H, Saito J, Tanabe A, Amada T, Asakura T, Kitagawa K, et al. Characterization of novel insulin fibrils that show strong cytotoxicity under physiological pH. *J Pharm Sci.* 2016;105:1419–26.
50. Grudzielanek S, Velkova A, Shukla A, Smirnovas V, Tatarek-nossol M, Rehage H, Kapurniotu A, Winter R. Cytotoxicity of insulin within its self-assembly and amyloidogenic pathways. *J Mol Biol.* 2007;370:372–84.
51. Bouchard M, Zurdo J, Nettleton EJ, Dobson CM, Robinson CV. Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. *Protein Sci.* 2000; 9:1960–67.
52. Nettleton EJ, Tito P, Sunde M, Bouchard M, Dobson CM, Robinson CV. Characterization of the oligomeric states of insulin in self-assembly and amyloid fibril formation by mass spectrometry. *Biophys J.* 2000;79:1053–65.
53. Nielsen L, Frokjaer S, Carpenter JF, Brange J. Studies of the structure of insulin fibrils by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and electron microscopy. *J Pharm Sci.* 2001;90:29–37.
54. Jiménez JL, Nettleton EJ, Bouchard M, Robinson CV, Dobson CM, Saibil HR. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:9196–201.

55. Ahmad A, Millett IS, Doniach S, Uversky VN, Fink AL. Partially folded intermediates in insulin fibrillation. *Biochem.* 2003;42:11404–16.
56. Ivanova MI, Sievers S a, Sawaya MR, Wall JS, Eisenberg D. Molecular basis for insulin fibril assembly. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:18990–5.
57. Wang SSS, Liu KN, Han TC. Amyloid fibrillation and cytotoxicity of insulin are inhibited by the amphiphilic surfactants. *Biochim Biophys Acta-Mol Basis Dis.* 2010;1802:519–30.
58. Kitagawa K, Misumi Y, Ueda M, Hayashi Y, Tasaki M, Obayashi K, et al. Inhibition of insulin amyloid fibril formation by α -cyclodextrins. *Amyloid.* 2015;25:181-6.
59. Lee YH, Ozawa D, Goto Y. New world of amyloid science. *Seikagaku.* 2009;81:677–87.
60. Manuscript A: Molecular mechanism of thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta* 2011;1804:1405–12.
61. 日本イーライリリー株式会社 ヒューマリン注インタビューフォーム 第12版. 2014.
62. Kerr D, Wizemann E, Sensi J, Zacho M, Ampudia-Blasco FJ, Affiliations A, et al. Stability and performance of rapid-acting insulin analogs used for continuous subcutaneous insulin infusion: A systematic review. *J Diabetes Sci Technol.* 2013;77:1595-606.
63. Van Dijk PR, Logtenberg SJ, Groenier KH, Haveman JW, Kleefstra N, Bilo HJ. Complications of continuous intraperitoneal insulin infusion with an implantable pump. *World J Diabetes.* 2012;3:142–8.
64. Woods RJ, Alarcon J, Mcvey E, Pettis RJ. Intrinsic fibrillation of fast-acting insulin analogs. *J Diabetes Sci Technol.* 2012;6:265–76.
65. サノフィ株式会社 ランタス注インタビューフォーム 第9版. 2015.
66. ノボ ノルディスクファーマ株式会社 レベミル注インタビューフォーム 第8版. 2013.
67. ノボ ノルディスクファーマ株式会社 トレシーバ注インタビューフォーム 第2版. 2013.

68. 堀籠 博亮, 井上 明弘, 森脇 紀親, 杉井 寛. 分子修飾に基づく創薬:インスリンおよび GLP-1 の分子修飾とその機能. DDS. 2016;31:5.
69. Kessler J, Yamamoto S, Bouř P. Establishing the link between fibril formation and raman optical activity spectra of insulin. *Phys Chem Chem Phys*. 2017;19:13614–21.
70. Dong J, Wan Z, Popov M, Carey PR, Weiss MA. Insulin assembly damps conformational fluctuations: Raman analysis of amide I linewidths in native states and fibrils. *J Mol Biol*. 2003;330:431–42.
71. Wood SP, Blundell TL. The relation of conformation and association of insulin to receptor binding; X-Ray and circular-dichroism studies on bovine and hystricomorph insulins. 1975;542:531–42.
72. 山本 昌. ペプチド・タンパク性医薬品の新規 DDS 製剤の開発と応用. 株式会社 メディカルドゥ. 2011;1:86-96.
73. Lor JP, Edwards JO. Polyol Complexes and structure of the benzenboronate ion. *J Org Chem*. 1959;24:769–74.
74. Pan X, Yang X, Lowe CR. Evidence for a cross-linking mechanism underlying glucose-induced contraction of phenylboronate hydrogel. *J Mol Rec*. 2008;21:205–9.
75. Ellis GA, Palte MJ, Raines RT. Boronate-Mediated Biologic Delivery. *J Am Chem Soc*. 2012;134:3631-4.
76. Andersen KA, Smith TP, Lomax JE, Raines RT. Boronic Acid for the Traceless Delivery of Proteins into Cells. *ACS Chem Biol*. 2016;11:319–23.
77. Baudyš M, Uchio T, Mix D, Kim SW, Wilson D. Physical stabilization of insulin by glycosylation. *J Pharm Sci*. 1995;84:28-33.
78. Lee S, Kim K, Kumar TS, Lee J, Sang KK, Dong YL, et al. Synthesis and biological properties of insulin-deoxycholic acid chemical conjugates. *Bioconjug Chem*. 2005;16:615–20.

79. Hentz NG, Richardson JM, Sportsman JR, Daijo J, Sittampalam GS. Synthesis and characterization of insulin–fluorescein derivatives for bioanalytical applications. *Anal Chem.* 1997;69:4994–5000.
80. Takei C, Ohno Y, Seki T, Miki R, Seki T, Egawa Y. Sugar–responsive layer–by–layer film composed of phenylboronic acid–appended insulin and poly(vinyl alcohol). *Chem Pharm Bull.* 2018;66.
81. Lu YW, Chien CW, Lin PC, Huang L De, Chen CY, Wu SW, et al. BAD-lectins: Boronic acid-decorated lectins with enhanced binding affinity for the selective enrichment of glycoproteins. *Anal Chem.* 2013;85:8268–76.
82. Burnett T, Herry C. Synthesis of a fluorescent boronic acid which reversibly binds to cell walls and a diboronic acid which agglutinates erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1980;96:157-62.
83. Kikuchi M, Hirokawa N, Hagiwara S, Nakayama H, Taneda S, Manda N, et al. Ultrasonography improves glycemic control by detecting insulin–derived localized amyloidosis. *Ultrasound in Med and Biol.* 2017;43:2284-94.
84. Nakamura M, Misumi Y, Nomura T, Oka W, Isoguchi A, Kanenawa K, et al. Extreme adhesion activity of amyloid fibrils induces subcutaneous insulin resistance. *Diabetes.* 2019;68:609–16.
85. Nagase T, Iwaya K, Kogure K, Zako T, Misumi Y, Kikuchi M, et al. Insulin–derived amyloidosis without a palpable mass at the insulin injection site:A report of two cases. *J Diabetes Investig.* 2020. doi:10.1111/jdi.13199.
86. Asztely A, Havel G, Ekstrom J. Vascular protein leakage in the rat parotid gland elicited by reflex stimulation, parasympathetic nerve stimulation and administration of neuropeptides. *Regul Pept.* 1998;77:113–20.
87. Huggenberger R, Siddiqui SS, Brander D, et al. An important role of lymphatic vessel activation in limiting acute inflammation. *Blood.* 2011;117:4667–78.